Série A, n° 1001
N° d'ordre : 1025

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(mention Sciences)

par

Elisabeth PERNOT, née DONON

PREMIÈRE THÈSE

Recherche immunochimique
sur les constituants antigéniques des spermatozoïdes de cobaye

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

soutenues le 1er Mars 1962 devant la Commission d'Examen

Mlle LE BRETON Président

M. TONNELAT
Mlle VEIL } Examinateurs

Série A, n° 1001
N° d'ordre : 1025

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(mention Sciences)

par

Elisabeth PERNOT, née DONON

PREMIÈRE THÈSE

Recherche immunochimique
sur les constituants antigéniques des spermatozoïdes de cobaye

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

soutenues le 1er Mars 1962 devant la Commission d'Examen

Mlle LE BRETON Président

M. TONNELAT
Mlle VEIL } Examinateurs

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen . . . . . **M. ZAMANSKY**

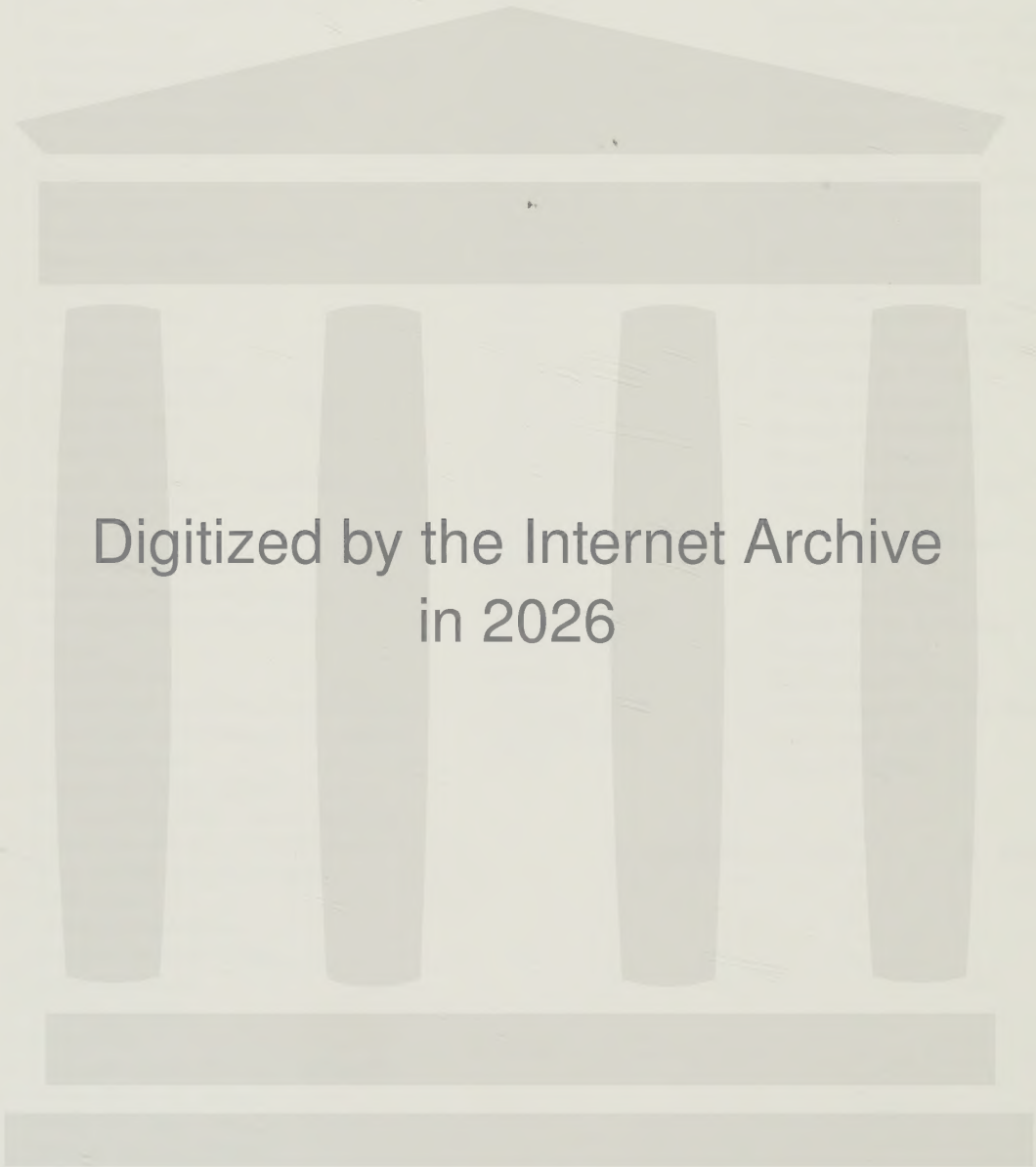
G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure	HOCART	T Minéralogie et Cristallographie
DE BROGLIE	T Théories Physiques	J. P. MATHIEU	T Physique (Optique)
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées	COUTEAUX	T Biologie Animale (P. C. B.)
GRASSE	T Evolution des êtres organisés	MAY	T Zoologie (Orsay)
PREVOST	T Chimie organique	CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie
CHAUDRON	T Chimie appliquée	FELDMANN	T Biologie Végétale Marine
WYART	T Minéralogie et Cristallographie	GUINIER	T Physique des Solides (Orsay)
TEISSIER	T Zoologie	JOST	T Physiologie comparée
MANGENOT	T Biologie Vég. (Orsay)	FORTET	T Calcul des Probabilités et Physique Math.
AUGER	T Physique quantique et Relativité	SCHARTZ	T Calcul différentiel et Intégral
MONNIER	T Physiologie Générale	CHOUARD	T Physiologie Végétale
PIVETEAU	T Paléontologie	MALAVARD	T Aviation (Techn. Aéronaut.)
ROCARD	T Physique (E. N. S.)	BRELOT	T Calcul différentiel et intégral
CARTAN	T Mathématiques (E. N. S.)	NORMANT	T Synthèse Organique générale
LAFFITTE	T Chimie Générale	BENARD	T Chimie Minérale
FAVARD	T Géométrie supérieure	BUVAT	T Botanique (E. N. S.)
COULOMB	T Physique du Globe	DUGUE	T Statistiques Mathématiques
Mlle COUSIN	T Biologie Animale (S. P. C. N.)	SOULAIRAC	T Psychophysiologie
CHRETIEN	T Chimie minérale	ULRICH	T Physiologie Végétale
DRACH	T Zoologie	MARECHAL	T Optique théorique et Appl.
KASTLER	T Physique (E. N. S.)	KIRRMANN	T Théories Chimiques
EPHRUSSI	T Génétique	CHADEFAUD	T Botanique
RIVIERE	T Géologie (S. P. C. N.) et sédim.	Mlle LE BRETON	T Physiologie de la Nutri.
GAUTHERET	T Biologie Végétale (P. C. B.)	SALEM	T Mathématiques générales
LUCAS R.	T Recherches Physiques	LELONG	T Applic. de l'analyse à la Géométrie
THOMAS A.	T Biologie cellulaire	DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées
ARNULF	T Optique appliquée	EHRESMANN	T Topologie Algébrique
MORAND	T Physique Enseignement	FRANÇON	T Physique (S. P. C. N.)
SOLEILLET	T Physique (P. C. B.)	GLANGEAUD	T Géographie physique et géologie dynamique
FORTIER	T Mécan. expérimentale des fluides	GODEMENT	T Mathématiques (M. P. C.)
DANJON	T Astronomie	PISOT	T Techn. Mathém. de la Phys.
PETIT	T Biologie maritime	ROCH	T Géologie
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique	SCHATZMAN	T Astrophysique
GALLIEN	T Embryologie	TERMIER	T Paléontologie stratigraphique
EICHHORN	T Botanique	ZAMANSKY	T Mathématiques générales
DE CUGNAC	T Biologie Végétale (S. P. C. N.)	LENNUIER	T Physique (M. G. P.)
Mlle CAUCHOIS	T Chimie Physique	RIZET	T Génétique (Orsay)
THELLIER	T Physique du Globe	ROUTHIER	T Géologie appliquée
L'HERITIER	T Biologie Générale (Orsay)	Mme TONNELAT	T Physique Théorique
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay)	DIXMIER	T Mathématiques (M. P. C.)
PONCIN	T Mécanique Générale	SOUCHAY	T Chimie générale
DUBREIL	T Arithmétique et Théorie des Nombres	AIGRAIN	T Electrotechnique générale
QUELET	T Chimie Organique	BRUSSET	T Chimie systématique
CAGNIARD	T Géophysique appliquée	M. LEVY	T Physique théor. des hautes Energies (Orsay)
CHAMPETIER	T Chimie Macromoléculaire	Mme CHAIX	T Chimie biologique
CUVILLIER	T Micropaléontologie	Mme HUREL-PY	Biologie Végétale (P. C. B.)
JUNG	T Pétrographie	PIAUX	T Chimie (M. P. C.)
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique	BRUN	T Mécan. théorique des fluides
WIEMANN	T Chimie organique et struct.	LEDERER	T Chimie biologique
JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique Céleste (Orsay)	Mme DUBREIL	T Mathématiques (Agrégation)
VASSY	T Physique de l'Atmosphère	Mme LELONG	T Mathématiques (E. N. S.)
DESTOUCHES	T Théories Physiques	BELLAIR	T Géologie (S. P. C. N.)
AMIEL	T Chimie Générale	COTTE	T Physique électricité

DUBOIS J. E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.)
MICHEL A.	T	Chimie Minérale (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie Physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie végétale (B. M. P. V.)
CASTAING	T	Physique (Orsay)
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie
MOYSE	T	Physiologie végét. (Orsay)
NOIROT	T	Evolution des êtres organisés
PANNETIER	T	Chimie générale (Orsay)
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie théorique
TEILLAC	T	Physique Nucléaire et Radioactivité
TONNELAT	T	Biologie physico-chim.
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie (P. C. B.)
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches Physiques
GUINOCHET	T	Biologie vég. (S. P. C. N.) (Orsay)
ROLLET	T	Chimie (P. C. B.)
Mlle JOSIEN	T	Chimie (S. P. C. N.)
CHEVALLEY	T	Géomét. algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay)
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie Physique
BERTHELOT	T	Physique Fond. des Hautes Energies (Orsay)
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère
Mme ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie
FRIEDEL	T	Physique des Solides (Orsay)
M. JULIA		Etude des Moléculaires naturel. complexes
LENDER	T	Biologie Animale (S. P. C. N.) Orsay
MAGAT		Physico-chimie des radio-éléments
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiologie Animale (Orsay)
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie
LEMEE	T	Physiologie Végét. B. M. P. V. (Orsay)
GUERIN	T	Chimie (M. P. C.) (Orsay)
CHATELET M.	T	Chimie (P. C. B.)
JEAN	T	Physique Nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique (S. P. C. N.)
MICHEL L.		Physique Théor. des Hautes Energies (Orsay)
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay)
BERTEIN	T	Electronique (Orsay)
BOUISSIERES		Chimie des Radioéléments (Orsay)
Mme COUTURE	T	Thermodynamique et Mécanique Physique
ELLENBERGER	T	Géologie appli. sur le terr.
FRANC		Biologie Animale (P. C. B.)
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay)
STOLKOWSKI		Physiologie générale
ACHER		Chimie Biol. (Orsay)
BAUDOIN		Biologie Animale (P. C. B.)
BEAUMONT		Biologie Animale (S. P. C. N.)
BLAMONT	T	Géophysique Ionosphère
BOURREAU		Botanique
CURIE D.		Physique (M. G. P.)
DURAND-DELGA		Géologie
FREON	T	Chimie organique (Orsay)
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des Probabilités
CAILLEUX		Géologie (S. P. C. N.)
MAGNAN	T	Physique (S. P. C. N.)
DAUDEL	T	Mécanique Ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire
Mlle FOURCROY		Biologie Végétale (S. P. C. N.)
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Mécanique Analytique et Mécanique Céleste
Mlle VEIL		Physiologie Cénérale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique Physique et Expérimentale
LAGOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires
BROCHARD	T	Physique P. C. B. (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématiques M. P. C. (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
CAIRE		Géographie Physique et Géol. dynamique
COMOLET	T	Mécanique des Fluides
CORABŒUF		Physiologie Animale
DELLOUE		Physique de l'Exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie Animale (P. C. B.)
JULLIEN J.		Chimie P. C. B.
MALGRANGE	T	Tech. Math. de la Physique
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE		Physique (E. N. S.) (Orsay)
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay)
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T	Mathématiques (E. N. S.) féminines
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay)
THIRY	T	Mécanique céleste

Le Secrétaire Général . . . . R. POULLAIN

A mon mari

A mes enfants


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538128_0006

A Monsieur Pierre GRABAR

Chef de Service à l'Institut Pasteur.

en témoignage de notre profonde reconnaissance pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son service et pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués au cours de ce travail.

A Monsieur le Professeur KOURILSKY

Professeur de Clinique à la Faculté de Médecine,
Médecin de l'hôpital Saint-Antoine.

qui nous a initiée à la recherche et nous a permis de commencer ce travail dans son laboratoire, en signe de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur TREFOUEL

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine,
Directeur de l'Institut Pasteur.

en signe de notre gratitude pour
l'autorisation de travailler à
l'Institut Pasteur et pour l'intérêt
qu'il nous a manifesté au cours
de ce travail.

A Mademoiselle LE BRETON

Professeur à la Faculté des Sciences

qui nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse, avec
notre reconnaissance pour la
bienveillance qu'elle nous a toujours
témoignée.

Nous remercions tous nos camarades du Service de Chimie Microbienne de l'Institut Pasteur, qui, par leurs conseils et leur aide, ont contribué à ce travail, en particulier Mademoiselle Nicole BENHAMOU.

Nous exprimons également notre reconnaissance à Monsieur Guy VOISIN, chef de laboratoire à l'hôpital Saint-Antoine, et à Monsieur Paul SZUMOWSKI, attaché au Laboratoire de Zootechnie de l'Institut national de la Recherche agronomique, Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort.

RECHERCHE IMMUNOCHIMIQUE SUR LES CONSTITUANTS ANTIGENIQUES DES SPERMATOZOIDES DE COBAYE

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES

I - METHODE D'EXTRACTION DES SPERMATOZOIDES 7

II - PREPARATION DES IMMUNSERUMS 10

III - METHODES GENERALES UTILISEES AU COURS DE CE TRAVAIL 11

A - Méthodes électrophorétiques :

1°/ Electrophorèse en phase liquide 11

2°/ Electrophorèse simple en milieu gélifié 12

B - Méthodes immunochimiques :

1°/ Epreuve du disque 13

2°/ Précipitation spécifique en milieu gélifié . . . 13

3°/ Analyse immuno-électrophorétique 14

C - Dosage d'azote 15

CHAPITRE II - COMPOSITION GENERALE DES SPERMATOZOIDES ET DU PLASMA SEMINAL DE COBAYE

1°/ Dénombrement des constituants d'après leurs mobilités électrophorétiques

a) Sérum de cobaye 16

b) Plasma séminal 17

c) Extrait de Queues 19

Pages

2°/ Comparaison de ces trois préparations et recherche de leurs constituants communs

a) Comparaison de l'extrait de queues et du plasma séminal 21

b) Etude de l'extrait de queues à l'aide de l'immunsérum anti-têtes 22

c) Comparaison du plasma séminal et du sérum sanguin 24

Plasma séminal de taureau 24

d) Comparaison de l'extrait de queues et du sérum sanguin 26

RESUME 27

CHAPITRE III - FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS

I - Relargage au Sulfate d'Ammonium

Méthode 29

Résultats 30

Conclusion 32

II - Elution de la gélose après électrophorèse en milieu gélifié

Méthode 32

Résultats

1°/ Elution avec ClNa à 8,5 p. 1.000 34

2°/ Elution par congélation et décongélation . . 35

Conclusion 37

Remarque sur l'obtention de glycoprotéines 37

Pages

CHAPITRE IV - RECHERCHE DE QUELQUES ENZYMES ET SPECIALEMENT DE L'ATPase. 39

METHODE DE MESURE DE L'ACTIVITE ATPasique 40

RESULTATS

I - Etude de l'ATPase sur différents extraits totaux de queues

1°/ L'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en enzymes 42

2°/ Action de la congélation sur l'ATPase . . . 43

3°/ Comparaison des extraits $Q\varphi$, Q_{WE}, N.100 obtenus avec ou sans vibrations soniques 44

a) Comparaison de $Q\varphi$ et Q_{WE} extraits par vibrations soniques 44

b) Comparaison de Q_{WE} extrait avec ou sans vibrations soniques 45

c) Comparaison simultanée de l'activité ATPasique des extraits 46

4°/ Activité ATPasique du plasma séminal . . . 50

II - Activité ATPasique des fractions de relargage . 51

III - Activité ATPasique des fractions obtenues par élution 56

IV - Action des globulines du sérum de lapin normal sur l'ATPase 58

CONCLUSION 60

CONCLUSIONS GENERALES 62

BIBLIOGRAPHIE 69

INTRODUCTION

Parmi les substances organiques antigéniques, les spermatozoïdes se comportent de manière particulière. En 1900, déjà METALNIKOFF (28) avait montré que les spermatozoïdes comptent parmi les rares cellules qui peuvent être auto-antigéniques. Il avait injecté à des cobayes leur propre sperme, et constaté la présence, dans leur sérum, de "spermatotoxines" qui immobilisaient les spermatozoïdes en présence d'alexine.

Une cinquantaine d'années plus tard, VOISIN, DELAUNAY et BARBER (47) provoquaient des lésions testiculaires chez le cobaye en lui injectant des broyats de testicules ou de spermatozoïdes homologues additionnés d'adjuvants. Ils hésitèrent tout d'abord à attribuer ces effets à une auto-sensibilisation car les adjuvants seuls pouvaient parfois produire des lésions analogues.

Mais FREUND, LIPTON et THOMPSON (10 et 11), deux ans plus tard, montraient que ces lésions étaient spécifiques et ne pouvaient pas être attribuées à l'action des adjuvants seuls. En sensibilisant des cobayes avec des testicules homologues ou autologues additionnés d'adjuvants, VOISIN et DELAUNAY (48), FREUND, THOMPSON et LIPTON (12), en 1955, obtenaient des réactions anaphylactiques généralisées, et KATSH (19 et 20), en 1958, des réactions de SCHULTZ-DALE (40 et 4) et des hypersensibilités cutanées.

Le sérum de ces animaux contient des anticorps circulants capables de provoquer une anaphylaxie cutanée passive (VOISIN, TOULLET et MAURER, 1958) (49).

Tous ces auteurs concluent que les lésions testiculaires obtenues sont dues à une auto-sensibilisation. Une conclusion analogue est apportée par WAKSMAN (50) qui décrit l'infiltration massive des lymphocytes et d'histiocytes au site des lésions testiculaires.

D'autre part MUDD et MUDD (29), en 1929, montraient que les spermatozoïdes possédaient à la fois une spécificité d'espèces et une spécificité d'organes. HENLE, HENLE et CHAMBERS, en 1938 (16) observaient, par une technique d'agglutination, l'existence de deux systèmes antigéniques, dans les spermatozoïdes de taureau, l'un spécifique des têtes, l'autre spécifique des queues. L'étude au microscope révèlait une agglutination des têtes entre elles, et des queues entre elles. SMITH (41), en 1949, montrait l'agglutination des queues de spermatozoïdes par les sérums d'animaux immunisés avec des spermatozoïdes de lapins, rats, souris ou cobayes.

RUMKE et HELLINGA (37) tout récemment, obtenaient différents types d'agglutinations des spermatozoïdes d'hommes stériles, avec le sérum des mêmes donneurs : agglutinations de queues entre elles, et agglutinations de têtes entre elles.

De son côté, ROSS (35), en 1946, mettait en évidence dans le sérum de lapin anti-plasma séminal humain, des précipitines,

en faible quantité pour la sérum-albumine, et en plus grande quantité pour les protéines séminales. Ces dernières ressemblaient aux globulines du sérum et donnaient des réactions croisées avec elles.

WEIL (51), en 1956, injectait des lapins avec du sperme total humain, du plasma séminal et des spermatozoïdes lavés, et obtenait des immunsérums spécifiques mais il n'a pas pu observer de distinctions entre le plasma séminal et les spermatozoïdes par les techniques immunologiques. Il lui a paru que les antigènes dominants provenaient du plasma séminal plutôt que des spermatozoïdes eux-mêmes.

LARSON et ses collaborateurs (22 et 23), en 1954, ont étudié les propriétés du plasma séminal bovin par électrophorèse, ultracentrifugation et analyse immunologique. Ils ont montré que les protéines du plasma séminal bovin sont hautement antigéniques. Par électrophorèse en phase liquide, ils ont distingué, dans le plasma séminal de taureaux normaux d'âges différents, 11 fractions, dont 3 ont la mobilité des α globulines sériques et constituent la majorité des protéines présentes. Ils n'ont observé de fraction correspondant à l'albumine sérique qu'à de très faibles concentrations. Ils remarquent de plus, que contrairement à ce que ROSS (35) et HUGGINS (18) ont pu voir chez l'homme, il y a peu d'analogie chez le taureau entre les protéines du plasma séminal et celles du sérum sanguin.

SZUMOWSKI, en 1956, (42), au moyen de l'électrophorèse sur papier, a constaté dans le plasma séminal bovin la présence d'une fraction assimilable à l'albumine variant, suivant les échantillons,

de 1,2 à 12,5 p. 100, alors que BRÜGGEMANN (1), en 1954, n'en avait pas trouvé par la même méthode.

Il apparaît que les spermatozoïdes d'une part, et le plasma séminal d'autre part sont très antigéniques et que leurs constituants antigéniques sont nombreux, et différents, pour la plupart, des constituants du sérum sanguin. Mais nous pouvons nous demander si ces deux liquides biologiques complexes possèdent des antigènes qui leur sont propres et d'autres communs.

Nous avons pensé que les techniques immunochimiques, qui se sont largement développées ces dernières années, pourraient nous apporter des précisions sur ces différents constituants antigéniques.

De plus, de nombreux travaux ont montré la richesse des spermatozoïdes en enzymes. Déjà, en 1941, LARDY et PHILIPPS (21) trouvaient dans les spermatozoïdes de taureau une déshydrogénase succinique et une phosphatase alcaline. Ils remarquaient que l'inhibition de ces enzymes n'affectait pas directement la motilité des spermatozoïdes. ZITTLE et ZITIN (55) étudiaient à la même époque la cytochrome-oxydase de ces mêmes cellules.

La présence d'une hyaluronidase dans les testicules a été constatée pour la première fois en 1940 par CHAIN et DUTHIE (2) et cet enzyme a fait l'objet de nombreux travaux dont l'essentiel a été mis en valeur par DELAUNAY et VOISIN en 1950 (5).

LUNDQUIST, en 1953, (26), observait dans le sperme humain la présence d'enzymes protéolytiques, dont une amino-peptidase et un pepsinogène.

Plus récemment, en 1959, l'activité de la déshydrogénase succinique est étudiée, également dans le sperme humain, par RAO, SHETH et PHADKE (34) et celle de la déshydrogénase lactique par MAC LEOD et WROBLEWSKI (24).

D'autre part, ENGELHARDT, en 1945, (7) remarquait, dans le sperme bovin, que la fonction motrice des spermatozoïdes était directement liée aux transformations de l'Adénosine-Tri-Phosphate (ATP) grâce à une ATPase analogue à la myosine du muscle et qu'il a appelée la spermyosine. Plus tard, en 1954, NELSON (30) trouvait une activité spécifique du type adényl-pyrophosphatase, presque entièrement localisée dans les queues de spermatozoïdes. Il remarquait, de plus, que les extraits flagellaires étaient peu actifs vis-à-vis du glycérophosphate, de l'adénylate de levure et du fructose diphosphate. Enfin, ENGELHARDT (8), en 1957, précisait que 80 % de l'activité ATPasique d'un homogénat de spermatozoïdes était localisée dans les queues.

Il paraissait donc intéressant d'étudier ce facteur important de la motilité des spermatozoïdes qu'est l'ATPase et de préciser à quel constituant antigénique il correspond dans les extraits où nous l'avons décelé.

°

° °

Le but de ce travail a été le dénombrement des antigènes des systèmes complexes que sont les spermatozoïdes et le plasma séminal, en vue d'en préciser la nature.

Cette étude n'a donc porté que sur les macromolécules et non sur la composition chimique des spermatozoïdes qui a fait l'objet de nombreux travaux dont le livre de MANN (27) donne une revue complète.

Ce travail a été effectué sur les spermatozoïdes de cobayes, et à titre de comparaison sur le plasma séminal de taureau.

Les constituants ont d'abord été dénombrés d'après leur propriétés antigéniques et classés, d'après leurs mobilités électrophorétiques. Les différents extraits obtenus ont ensuite été fractionnés, d'une part, par relargage au Sulfate d'Ammonium, d'autre part, par l'élution des protéines dans la gélose après leur migration électrophorétique. Enfin, nous avons tenté de caractériser certains constituants, en particulier l'ATPase dont le rôle paraît le plus important dans la motilité des spermatozoïdes.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I - METHODE D'EXTRACTION DES SPERMATOZOIDES

Les épidydimes de cobayes sont prélevés aussitôt après la saignée à blanc des animaux et les spermatozoïdes sont obtenus en perfusant à travers le canal déférent du ClNa à 8,5 pour 1.000, selon la technique décrite par HENLE (17). Cette suspension de spermatozoïdes est alors centrifugée et lavée à trois reprises avec du ClNa à 8,5 pour 1.000.

Le premier surnageant est concentré par pervaporation à travers un sac de cellophane et dialysé contre ClNa à 8,5 pour 1.000. C'est ce que nous avons appelé le "Plasma Séminal" (P), qui se trouve plus ou moins dilué suivant la perfusion. Ce liquide de suspension des spermatozoïdes n'a pas été conservé par les auteurs qui ont utilisé cette technique de prélèvement. ROSS (36) définit le plasma séminal comme étant le liquide de suspension des spermatozoïdes provenant de l'éjaculat, et obtenu par centrifugation. De même, WEIL (51) LARSON (22, 23), SZUMOWSKI (42, 43) qui ont étudié le plasma séminal de différentes espèces, l'ont obtenu à partir de l'éjaculat.

Les spermatozoïdes lavés sont remis en suspension dans ClNa à 8,5 pour 1.000 (généralement 20 ml pour les spermatozoïdes

de 40 cobayes). Cette suspension est soumise à l'action des vibrations soniques suivant la technique préconisée par HENLE (16), et décrite par CHAMBERS et FLOSDORF (3). Nous avons utilisé l'appareil de Raythéon de fréquence 10 Kc, grâce à l'obligeance de M. J. MONOD.

Nous avons choisi ce mode de désintégration, après avoir essayé plusieurs autres procédés qui ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants. Ainsi, après le broyage au Potter, le broyage dans un moulin à billes, le broyage avec du sable de Fontainebleau, les spermatozoïdes paraissent très peu touchés et les surnageants contiennent peu de protéines (la quantité d'azote dosée au micro-Kjeldahl est très faible). Les ultra-sons de fréquence 400 Kc et 800 Kc, étudiés grâce à l'aimable concours de M. PRUDHOMME, scindent en quelques minutes les spermatozoïdes en deux, et les queues semblent intactes, d'après l'examen au microscope. Nous n'avons pas réussi, en utilisant la centrifugeuse internationale et dans ce milieu, à séparer les têtes des queues. Nous ne disposions pas de centrifugeuse Spinco. D'autre part, l'extrait soluble obtenu, même après une heure d'ultra-sons, est beaucoup moins riche en protéines qu'après les vibrations de 10 Kc. (164 μ g de N par ml et 222 μ g de N par ml).

La désintégration par les vibrations soniques est poursuivie pendant trente minutes. Les spermatozoïdes sont ainsi coupés au collet et les queues sont presque complètement passées en solution, alors que les têtes ne sont pas affectées. Le contrôle est fait au microscope.

La suspension est alors centrifugée et le surnageant constitue l'extrait antigénique de queues $Q\varphi$. Cet extrait a un aspect moiré qui demeure même après centrifugation à 20.000 tours/min.

Pour les débarrasser de toutes traces de queues, les têtes sont remises en suspension dans la soude N/100, et soumises à nouveau aux vibrations soniques pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant est conservé et appelé N.100-$Q\varphi$.

Les têtes sont ensuite mises en suspension dans ClNa à 8,5 p. 1.000. Au microscope, elles apparaissent entières, non déformées, dans un milieu limpide. C'est cette suspension de Têtes, T, qui a servi uniquement pour obtenir l'immunsérum correspondant. En effet, aucun procédé n'a permis d'en extraire des fractions solubles dans ClNa à 8,5 pour 1.000, qui puissent être étudiées par les méthodes immunochimiques. ZITTLE et O'DELL (54), étudiant, en 1941, la solubilité des spermatozoïdes, suggéraient la présence, probablement à la surface des têtes, d'une protéine semblable à la kératine, qui est tout à fait insoluble dans la plupart des réactifs. De plus, la solubilité de ces cellules augmentait après l'action d'agents réducteurs tels que l'acide thioglycolique. Les protéines que nous avons mises en solution par ce procédé, ont précipité au cours de la dialyse contre ClNa à 8,5 pour 1.000.

Certaines suspensions de spermatozoïdes, après lavages, ont été extraites par la solution de Weber Edsall, solution de KCl 0,6 M tamponnée par CO_3Na_2 0,01M et CO_3HNa 0,04M (30) au lieu de ClNa à 8,5 pour 1.000. Elles étaient, ou non, soumises aux vibrations

soniques. Au microscope, les têtes n'apparaissent pas démolies ; nous avons donc uniquement en solution un extrait de queues, Q_{WE}.

Ce sont ces extraits de queues, soit en milieu physiologique, soit en milieu de Weber Edsall qui, après avoir été étudiés comparativement, ont été utilisés pour tenter d'en séparer les constituants.

II - PREPARATION DES IMMUNSERUMS

Les fractions décrites précédemment ont servi à immuniser des lapins de la façon suivante. Les antigènes, en solution (ou suspension pour les têtes), dans du ClNa à 8,5 pour 1.000, étaient injectés par voie intra-musculaire sous l'omoplate en deux fois à dix jours d'intervalle, en ajoutant les substances adjuvantes de FREUND. Chaque lapin recevait ainsi 10 mg de protéines environ. Puis un mois après, les lapins étaient rechargés en ajoutant cette fois-ci de l'alun comme adjuvant pendant deux ou trois semaines avec environ 10 mg de protéines par semaine pour chaque animal.

Les substances adjuvantes ont pour but de retarder la dispersion des protéines dans l'organisme. De plus, les traces de bacilles de Koch tués contenus dans les adjuvants de FREUND servent à provoquer, à l'endroit de l'injection, une réaction inflammatoire. Les lapins étaient saignés à blanc 8 à 10 jours après la dernière injection.

Les immunsérums obtenus avec les préparations P, Q et T sont appelés aP, aQ et aT. Comme système de référence nous avons utilisé le sérum de cobaye Sc et l'immunsérum anti-sérum de cobaye aSc.

Ces immunsérums étaient contrôlés, à des dilutions différentes, par épreuves du disque (ring-tests), pour avoir une première approximation de la concentration en anticorps et comparer les sérums entre eux. L'immunsérum aT n'a été vérifié qu'avec l'antigène de Queues. Lorsque la concentration en anticorps ne paraissait pas suffisamment élevée pour nous permettre d'appliquer les techniques immunochimiques de précipitation en milieu gélifié, les immunsérums étaient concentrés en précipitant les γ globulines par le sulfate d'ammonium à 33 p. 100 de saturation. Les préparations obtenues étaient ainsi quatre à six fois plus concentrées en anticorps que le sérum initial correspondant.

Comme nous avons affaire à un matériel biologique, signalons que la teneur en anticorps des immunsérums peut varier qualitativement et quantitativement d'un animal à l'autre. C'est pourquoi il paraît préférable de réunir les immunsérums de 5 à 6 lapins immunisés en même temps.

Malgré cette précaution, les lots ne semblent pas toujours contenir tous les mêmes constituants.

III - METHODES GENERALES UTILISEES AU COURS DE CE TRAVAIL

A - Méthodes électrophorétiques

1°/ Electrophorèse en phase liquide selon Tisélius

L'électrophorèse était poursuivie pendant 2 heures à + 2°C dans un tampon véronal (diéthyl-malonylurée sodique et acide + Nacl)

de pH 8,2 et de force ionique $\Gamma/2 = 0,1$. Le champ était de 4,5 volts/cm. A partir des courbes obtenues, du nombre et de la position des pics, il est possible de dénombrer les constituants et de calculer leurs mobilités électrophorétiques (exprimées en cm2 / volt / sec.) Les quantités respectives des substances sont calculées par planimétrie en décomposant les courbes supposées gaussiennes.

Cette méthode ne permet l'analyse des mélanges protéiques complexes qu'à des concentrations supérieures à 1,5 g de protéines pour 100 ml. C'est pourquoi elle n'a pu être utilisée que dans deux cas : le sérum de cobaye et le plasma séminal. En effet, les extraits obtenus à partir des spermatozoïdes ne contiennent pas plus de 1 g de protéines pour 100 ml, car à de plus grandes concentrations, il se produit un précipité dû, probablement, à une dénaturation des protéines.

2°/ Electrophorèse simple en milieu gélifié

La migration des protéines se fait dans un gel de gélose contenant 1,5 % de gélose environ et du tampon véronal de pH 8,2 et de force ionique $\Gamma/2 = 0,025$. Ce gel est coulé sur des plaques de verre photographique qui servent de support. La durée des électrophorèses est de 4 heures pour les plaques de 18 cm et de 1 heure 30 pour celles de 12 cm. Le champ est de 4,5 volts/cm environ pour les grandes plaques et de 8 volts/cm environ pour les petites.

Après l'électrophorèse, il est possible de fixer les protéines dans la gélose à l'aide d'acide acétique à 2 %, puis, une fois desséchées à 37°, de les révéler, sur la mince feuille obtenue, par des

colorants appropriés (44 et 45). Le colorant général des protéines utilisé est l'Amido-Schwartz. Comme la feuille de gélose est transparente, l'intensité des taches colorées peut être mesurée à l'aide du photomètre enregistreur de Zeiss.

Cette méthode d'électrophorèse présente plusieurs avantages :

D'une part, l'adsorption des protéines sur la gélose est généralement peu importante.

D'autre part, comme les protéines diffusent plus lentement dans ce gel que dans un milieu liquide, il est possible soit de les fixer à l'endroit même où elles se sont arrêtées après migration, soit de les séparer par élution.

B - Méthodes immunochimiques

1°/ L'épreuve du disque (ring-test), où la solution antigénique et l'immunsérum sont superposés dans un tube capillaire, permet de s'assurer de la présence dans les immunsérums d'anticorps précipitant la solution antigénique, donc correspondant à au moins un de ses constituants.

2°/ Précipitation spécifique en milieu gélifié

Nous avons utilisé la méthode de double diffusion d'OUCHTERLONY (31). La gélose à 1,5 p. 100 dans une solution de ClNa à 8,5 pour 1.000 est coulée dans des boîtes de Pétri. Les substances antigéniques et les immunsérums, introduits dans des

trous ménagés dans la gélose, diffusent et forment des lignes de précipitation spécifique. Cette méthode permet de dénombrer les constituants antigéniques de mélanges complexes et de les comparer entre eux.

En effet, deux solutions contiennent le même antigène si elles forment, avec le même immunsérum, deux lignes confluentes, deux antigènes différents si les lignes se croisent.

3°/ L'analyse immuno-électrophorétique, mise au point par GRABAR et WILLIAMS (14 et 15) allie l'électrophorèse à la double diffusion en milieu gélifié.

Dans un premier temps, les protéines migrent dans le gel de gélose.

Dans un deuxième temps, l'immunsérum est introduit dans des gouttières parallèles au sens de migration ; antigènes et anticorps diffusent alors perpendiculairement au sens de migration et forment des lignes de précipitation spécifique plus ou moins arquées au niveau où les protéines se sont arrêtées après migration.

La formation des arcs de précipitation est progressive et est suivie en faisant des photographies par simple contact.

Lorsque les arcs sont bien développés, la plaque de gélose peut être lavée pour éliminer les protéines qui n'ont pas réagi, puis séchée. Les lignes sont alors colorées à l'aide de divers colorants décrits par URIEL et GRABAR (45).

Pour la coloration générale des protéines, nous avons utilisé principalement le Rouge Ponceau, et, dans quelques cas, le Vert Lumière.

C - Les dosages d'azote

ont été effectués par la micro-méthode de KJELDAHL (25). La teneur en protéines était calculée en admettant un taux moyen de 16 p. 100 d'azote.

CHAPITRE II

COMPOSITION GENERALE DES SPERMATOZOIDES ET DU PLASMA SEMINAL DE COBAYE

1°/ Dénombrement des constituants d'après leurs mobilités électrophorétiques

Le plasma séminal et l'extrait total de queues sont comparés au sérum de cobaye et leurs constituants sont classés d'après les résultats des électrophorèses et des analyses immuno-électrophorétiques en systèmes homologues (l'extrait antigénique réagissant avec l'immunsérum correspondant).

Les principaux résultats de la double diffusion sont montrés sur la figure I et ceux des analyses immuno-électrophorétiques sur la figure II.

a) Le sérum de cobaye qui a servi de système de référence a été d'abord étudié au moyen d'une électrophorèse en phase liquide selon Tisélius. Il contient :

50 p. 100 d'albumine	de mobilité	$5,7\ 10^{-5}$	cm2 / volt / sec.
22 p. 100 d'α globuline	"	4,2	"
12 p. 100 de β globuline	"	3,9	"
16 p. 100 de γ globuline	"	0,6	"

L'analyse immuno-électrophorétique du Sérum de Cobaye Sc révélé par l'immunsérum anti-sérum de cobaye aSc permet de déceler les lignes de précipitation correspondant aux constituants suivants :

1 albumine assez importante

1 α_1 globuline et 2 α_2 globulines

1 β_1 globuline et 1 β_2 globuline

1 γ globuline

L'électrophorèse simple en milieu gélifié montre les 4 taches correspondant à ces constituants.

b) Le plasma séminal

Par électrophorèse en phase liquide les concentrations obtenues sont les suivantes :

20 à 25 p. 100 d'un constituant de mobilité	6,3 10^{-5}	cm2/volt/sec.
37 p. 100 d'albumine	4,8	"
10 p. 100 d'α globuline	3,4	"
7 p. 100 de β globuline	2,4	"
21 p. 100 de γ globuline	0,6	"

Il y a donc un constituant plus rapide que l'albumine ; de plus l'albumine et les α et β globulines semblent plus lentes que dans le sérum de cobaye.

La méthode de double diffusion dans la gélose permet de constater la complexité du Plasma Séminal. En effet, dans la réaction de P avec aP il apparaît 6 lignes de précipitation après 9 jours et au

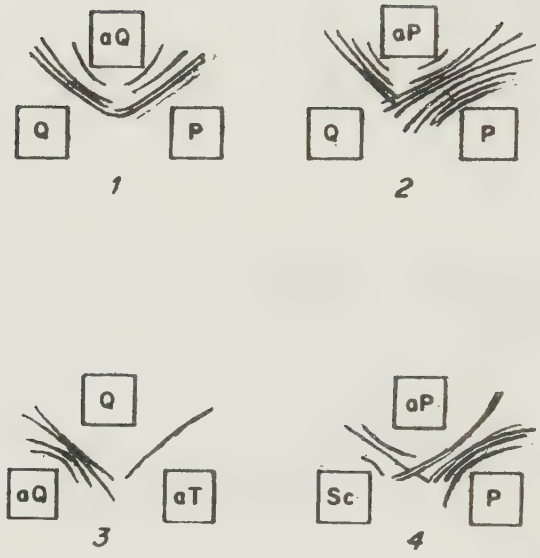


Fig. I - Comparaison, par la méthode OUCHTERLONY, de l'extrait de queues Q, du plasma séminal P et du sérum de cobaye S.c., par rapport aux immunsérums anti-plasma séminal aP, anti-queues aQ et anti-têtes aT.

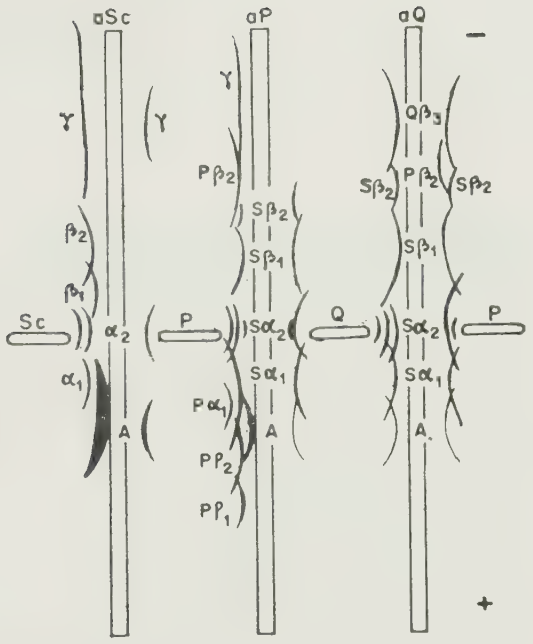


Fig. II - Schéma des lignes de l'analyse immuno-électrophorétique. Comparaison des constituants du plasma séminal, de l'extrait de queues et du sérum de cobaye, révélés par les immun-sérums anti-plasma séminal aP, anti-queues aQ, et anti-sérum de cobaye aSC.

A désigne la sérumalbumine du sérum de cobaye.
α , β et γ les globulines du sérum de cobaye.

$P\alpha_1$ et $P\beta_2$ les α et β globulines caractéristiques du plasma séminal.

$P\rho_1$ et $P\rho_2$ les constituants rapides décelés dans le plasma séminal.

$S\alpha$ et $S\beta$ les globulines du sperme (spermatozoïdes et plasma séminal).

$Q\beta_3$ la β globuline caractéristique des extraits de queues.

moins 10 après 1 mois. Il ne semble pas que la multiplicité de ces traits de précipitation provienne d'un dédoublement non spécifique (38 et 39) puisque leur aspect et leurs rayons de courbure sont différents.

Au cours de l'analyse immuno-électrophorétique du système homologue plasma séminal P - immunsérum anti-plasma séminal aP, nous voyons apparaître 11 constituants. Deux d'entre eux ont des mobilités supérieures à celle de l'albumine, ce qui confirme les résultats de l'électrophorèse en phase liquide. Ces constituants appelés ρ_1 et ρ_2 dans le sérum sanguin par WILLIAMS et GRABAR (52), donnent l'image d'une réaction croisée, quelles que soient la préparation antigénique et la proportion antigène-anticorps.

L'analyse immuno-électrophorétique révèle, d'autre part, 1 albumine, 2 α_1 globulines de mobilités différentes, au moins 3 α_2 globulines, 1 β_1 globuline, 2 β_2 globulines (dont une très faible, parfois seulement amorcée, qui prolonge la β_1 globuline) et 1 γ globuline, ligne longue et peu arquée.

Les constituants séparés après l'électrophorèse simple en milieu gélifié sont révélés par coloration et l'intensité des taches obtenues est enregistrée au photomètre de Zeiss. La figure III montre la concordance des résultats obtenus par ces différentes méthodes.

Nous constatons de plus une coloration intense dans le réservoir d'origine. Il se pourrait que : soit une partie des protéines ne migre pas par suite d'une diminution du degré de solubilité au cours

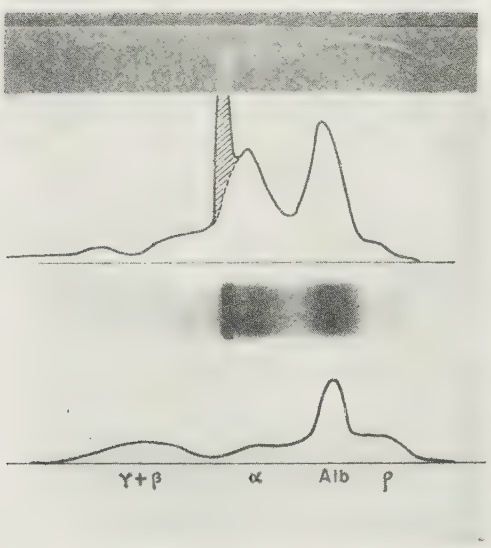


Fig. III - Comparaison des résultats immuno-électrophorétiques et électrophorétiques du plasma séminal.
De haut en bas : Photographie des lignes d'immuno-électrophorèse révélées par l'anti-sérum homologue.
- Diagramme d'enregistrement photométrique de l'électrophorèse en gélose.
- Photographie de l'électrophorèse en gélose.
- Diagramme de l'électrophorèse en phase liquide (frontière descendante).

de l'électrophorèse, ou par suite d'une dénaturation due à l'addition de la gélose, soit que leur déplacement se trouve annulé au niveau du réservoir.(*) Nous trouvons en effet trois lignes de précipitation en face du réservoir correspondant à des α_2 globulines.

Signalons que nous avions déjà remarqué la précipitation de certains constituants au cours de leur concentration par pervaporation.

c) L'extrait de Queues trop peu concentré en protéines (1,5 à 2 mg par ml) n'a pas pu être étudié par électrophorèse en phase liquide.

La méthode de double diffusion dans la gélose permet, dans la réaction de l'extrait de queues Q avec l'immusérum correspondant aQ de dénombrer au moins 4 constituants (figure I, 1 et 3).

Mais à l'analyse immuno-électrophorétique du système homologue Q - aQ, il apparaît au moins 7 lignes de précipitation. Nous ne voyons pas, comme dans le plasma séminal, de constituants rapides, mais $1\alpha_1$ globuline assez lente et $3\alpha_2$ globulines, puis $1\beta_1$ et $1\beta_2$ globulines dont, avec certains immunsérums anti-queues, les lignes de précipitation se prolongent, quelles que soient les préparations antigéniques de queues et les proportions antigènes-anticorps.

Ce fait pourrait être dû à la même spécificité immunologique de

---

(*) Rappelons en effet que la mobilité des protéines dans la gélose est la résultante de la mobilité électrophorétique et de l'électro-endosmose.

deux constituants différents par leurs mobilités électrophorétiques. Dans ce cas, on observerait cette ligne à deux courbures avec tous les antisérums et tous les mélanges antigéniques contenant ces constituants. En fait, cette coalescence ne semble pas exister dans la réaction de P et Q avec aP, ou aP épuisé par Sc. Ceci nous suggère que ces deux constituants sont hétérogènes du point de vue immunologique.

De plus, nous voyons une β globuline dont la mobilité se rapproche de celle des γ globulines, mais dont la ligne de précipitation est bien arquée. Nous l'avons appelée β_3 globuline. Il n'y a pas dans l'extrait de queues de ligne correspondant à la γ globuline du sérum.

Signalons enfin que certains lots d'immunsérums aQ, et aussi l'immunsérum aP, révèlent un constituant de même mobilité que l'albumine, mais donnant une ligne de précipitation assez faible. Il est possible que cette ligne corresponde à une trace d'albumine qui n'aurait pas été éliminée par les lavages, mais qui, par suite de sa très faible concentration, n'aurait pas pu former d'anticorps dans certains lots d'immunsérums.

L'électrophorèse simple en milieu gélifié montre, comme dans le plasma séminal, une très forte coloration du réservoir d'origine dont l'intensité permet de penser que la plus grande partie des protéines y est restée. Elle révèle, de plus, une tache moins forte et assez étalée, au niveau des α globulines, et 2 taches très faibles au niveau des β globulines.

2°/ Comparaison de ces trois préparations et recherche de leurs constituants communs

En faisant des précipitations en milieu gélifié suivant la méthode d'OUCHTERLONY, et des analyses immuno-électrophorétiques, nous avons fait réagir chaque milieu avec les immunsérums homologues des autres milieux (figures I et II).

a) Comparaison de l'extrait de Queues Q et du plasma séminal P

Par double diffusion on voit que deux lignes de précipitation de Q avec aQ et de P avec aQ sont confluentes. Deux autres lignes semblent l'être aussi, mais elles sont trop peu développées pour arriver à se joindre. Une cinquième ligne de précipitation très faible apparaît entre P et aQ (figure I, 1). Dans la réaction de Q et P avec aP (figure I, 2), les lignes de précipitation de Q n'apparaissent que si le réservoir destiné à P est rempli trois jours après celui de Q. Les quatre constituants de Q révélés ainsi donnent des lignes qui semblent se tourner vers celles de P, mais ne sont pas aussi nettement confluentes que dans la réaction précédente. Il est probable que les constituants de l'extrait de queues, révélés par cette méthode, se trouvent également dans le plasma séminal.

Par analyse immuno-électrophorétique de P avec aQ, il n'apparaît ni albumine, ni constituant β mais une α_1 globuline, une α_2 globuline très nette et une autre très faible. Il apparaît de plus comme dans la réaction de Q avec aQ une β_1 et une β_2 globuline qui se prolongent. Il existe aussi une autre β_2 globuline très faible correspondant à celle qui a été décelée dans la réaction de P avec aP.

Dans la réaction de Q avec aP on peut déceler une très faible ligne correspondant à l'albumine, les mêmes α_1 et α_2 globulines que ci-dessus, et enfin les mêmes β_1 et β_2 globulines qui se prolongent.

Il résulte de ces dernières analyses immuno-électrophorétiques que, parmi les constituants de l'extrait de queues révélés par aQ, seule la β_3 globuline semble spécifique des queues, les autres étant communs avec le plasma séminal.

Nous pouvons nous demander si ces constituants communs sont propres au plasma séminal ou s'ils proviennent des spermatozoïdes détruits "in vivo".

Cependant la β_3 globuline n'a pas formé d'anticorps dans les sérums anti-plasma séminal. Nous ne la trouvons que dans la réaction de Q avec aQ, et, très faiblement, dans celle de P avec aQ. Ces résultats permettent de penser qu'elle existe dans le plasma séminal, en quantité extrêmement faible et insuffisante pour former des anticorps correspondants chez les lapins anti-plasma séminal. La β_3 globuline semble donc une protéine spécifique des spermatozoïdes. Nous l'avons appelée $Q\beta_3$ globuline. Alors que les autres constituants appartenant au sperme total (spermatozoïdes et plasma séminal) sont appelés $S\alpha_1$, $S\alpha_2$ (il y en a deux), $S\beta_1$ et $S\beta_2$ globulines.

b) Etude de l'extrait de Queues Q à l'aide de l'immunsérum anti-Têtes aT

La ligne de précipitation de Q avec aT qui apparaît en double diffusion dans la gélose (figure I, 3) est très nette. Mais il

est difficile d'affirmer qu'elle soit confluente avec une des quatre lignes apparaissant entre Q et aQ.

L'analyse immuno-électrophorétique de Q avec aT met en évidence, au niveau de la β_3 globuline décelée dans l'extrait de queues, une ligne de précipitation très nette. Ce résultat permet de penser que les Têtes contiennent, elles aussi, la $Q\beta_3$ globuline. En effet, n'ayant pu obtenir un extrait soluble de têtes en milieu physiologique, et le faire réagir sur aT, nous ne pouvons affirmer qu'il s'agisse d'un antigène commun aux têtes et aux queues.

Il semble peu probable, cependant, que ce soit une impureté de queues mêlée à la suspension de têtes qui ait produit des anticorps dans l'immunsérum aT, puisque les autres constituants de queues n'en ont pas formé alors qu'ils sont en plus grande proportion.

Signalons toutefois que la solution N.100-Qφ (Soude N/100 ayant servi à débarrasser les têtes de toutes traces de queues) révélée par aQ et par aT contient une α_1 globuline mais pas de β globuline du tout : la $Q\beta_3$ globuline a peut-être été détruite par la Soude N/100. D'autre part, il est curieux de constater que l' α_1 globuline n'apparaît pas dans la réaction de Q avec aT. Nous pouvons nous demander s'il s'agit de la même $S\alpha_1$ globuline que dans Q car sa ligne de précipitation est plus floue. Notons cependant que cette protéine semble être le constituant porteur de l'activité ATPasique, et dans les extraits de queues, et dans l'extrait N.100-Qφ .

c) Comparaison du plasma séminal P et du sérum sanguin Sc

Dans la réaction du sérum de cobaye et de l'immunsérum anti-plasma séminal aP la méthode de double diffusion dans la gélose (figure I, 4) fait apparaître trois lignes de précipitation. Comme dans les expériences précédentes, l'évolution des lignes est très lente et il est difficile d'affirmer qu'elles soient confluentes avec certaines des lignes de précipitation de P aveo aP.

Par l'analyse immuno-électrophorétique nous avons constaté que les trois constituants communs à ces deux milieux sont l'albumine une α_2 globuline et la γ globuline. Après épuisement de aP par le sérum sanguin, les lignes de précipitation de ces trois constituants n'apparaissent plus. L'albumine cependant semble migrer plus lentement dans le plasma séminal que dans le sérum sanguin, ce qui ferait supposer que l'albumine a subi une légère modification. Il paraît donc peu probable qu'il s'agisse d'impuretés restées dans le plasma séminal après les prélèvements, d'autant plus que les trois lignes de précipitation sont très nettes. Il semble que ces constituants soient présents dans le plasma séminal par suite d'un processus "in vivo".

Contrairement à ce qu'on a vu pour d'autres sérums, (homme, poule), (45), nous n'avons pas observé les constituants β dans le sérum de cobaye. Il est possible que ce soit dû à l'âge des animaux ayant fourni le sérum sanguin, mais nous n'avons pas pu le vérifier.

Au cours d'un travail poursuivi sur le Plasma Séminal de taureau (33), l'identité de l'albumine présente et de la sérum-albumine bovine a pu être montrée à l'aide de la méthode de double diffusion dans la gélose.

D'autre part, une trentaine d'échantillons de plasma séminal de taureau ont été étudiés par électrophorèse en milieu gélifié. Après coloration à l'Amido-Schwartz, les taches correspondant aux protéines étaient enregistrées au photomètre de Zeiss ; le pourcentage de chaque constituant était calculé sur chaque courbe par planimétrie. De plus, des analyses immuno-électrophorétiques permettaient de comparer les constituants à ceux du sérum bovin.

Parallèlement les caractères morphologiques et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes étaient étudiés.

Ces résultats ont montré d'une part que la concentration de l'albumine dans le plasma séminal variait entre 1 et 9 pour 100 environ d'un animal à l'autre, et d'autre part que près de 50 p. 100 des échantillons de sperme étudiés pouvaient être considérés comme pathologiques. Il est permis de penser que l'apparition de l'albumine dans le plasma séminal est liée aux troubles de la spermatogénèse. Ce phénomène pourrait être dû à des processus exsudatifs dans le tractus génital qui exerceraient, à leur tour, une influence sur les spermatozoïdes eux-mêmes (43).

De plus, le fait que l'albumine existe parfois en quantité relativement élevée dans le plasma séminal semble permettre de prévoir les éventuelles altérations du pouvoir fécondant du sperme, même si les spermiogrammes sont normaux au moment de l'examen. Par exemple, sur dix échantillons de plasma séminal considérés comme normaux, six ont montré, après l'électrophorèse, une concentration d'albumine au-dessus de 3 pour 100. Or, les six taureaux correspondants ont été éliminés de l'élevage au cours des deux années

suivantes probablement parce qu'ils n'étaient plus bons reproducteurs.

On peut se demander si certains états pathologiques sont dus à une agglutination des spermatozoïdes, donc à la présence d'agglutinines qui sont généralement des γ globulines.

Or, nous constatons que dans certains échantillons dont la teneur en albumine semblait plus importante, la teneur en globuline était également plus grande.

Ce passage de constituants du sérum dans le plasma séminal pourrait alors expliquer les anomalies de fertilité de certains spermes. Cette hypothèse rejoindrait les travaux de RUMKE (37) qui constate une auto-agglutination des spermatozoïdes par des sérums d'hommes stériles, grâce à une agglutinine, "spermagglutinine" spécifique des spermatozoïdes.

Cette étude sur le plasma séminal de taureau permettrait donc de supposer que la présence d'albumine dans le plasma séminal de cobaye soit due à un phénomène analogue. Cependant, la quantité d'albumine de ce dernier, qui provient des épidydimes, est beaucoup plus grande que celle du premier provenant de l'éjaculat. Aussi le parallélisme ne peut-il pas être fait sans poser différentes questions que nous aborderons dans la conclusion générale.

d) Comparaison de l'extrait de queues Q et du sérum sanguin Sc

Les précipitations en milieu gélifié selon OUCHTERLONY et les analyses immuno-électrophorétiques ne font apparaître aucune ligne de précipitation soit de Q avec aSc, soit de Sc avec aQ. Il ne

semble donc pas que l'extrait de queues possède des constituants communs avec le sérum sanguin.

Signalons cependant la présence dans Q, à l'état de traces, d'un constituant migrant comme l'albumine, qui n'est révélé que par certains lots d'immunsérums aQ. Il est possible que ce constituant soit de l'albumine, restée après les lavages, mais en trop faible proportion pour être révélée par les systèmes hétérologues Q-aSc et Sc-aQ. Ce ne serait donc pas un constituant propre aux queues de spermatozoïdes. De même, une des trois α_2 globulines de l'extrait de queues, n'apparaît pas dans les systèmes Q-aP et P-aQ ; elle correspond probablement à l'α_2 globuline sérique, et n'existerait qu'à l'état de traces dans les extraits de queues.

RESUME -

Au cours de cette première série d'expériences, les constituants du plasma séminal et des spermatozoïdes ont pu être dénombrés d'après leurs propriétés antigéniques et classés suivant leurs mobilités électrophorétiques comparées à celles du sérum sanguin.

Le tableau ci-après réunit tous ces résultats.

Le plasma séminal possèderait au moins 12 constituants antigéniques et les extraits de queues 6. Parmi ces derniers, tous, sauf un, seraient communs avec le plasma séminal, ce sont : une α_1 globuline , deux α_2 globulines, une β_1 globuline et une β_2 globuline. Nous les avons appelés : $S\alpha_1$, $S\alpha_2$, $S\beta_1$, $S\beta_2$ globulines. Seule une β globuline, migrant comme les γ globulines sériques, mais donnant une ligne de précipitation bien arquée, serait

un constituant propre des spermatozoïdes, têtes et queues ; nous l'avons appelée Q β_3 globuline.

Parmi les constituants du plasma séminal, il apparaît, en plus des constituants communs aux extraits de queues, trois constituants également présents dans le sérum sanguin : l'albumine, une α_2 globuline et la γ globuline. Enfin, le plasma séminal possèderait, comme antigènes spécifiques, les constituants rapides que nous avons appelés P ρ_1 et P ρ_2, puis une α_1 globuline et une β_2 globuline appelées P α_1 et P β_2 globulines.

Par contre, l'extrait de queues n'aurait aucun constituant commun avec le sérum sanguin. L'albumine et l' α_2 globuline ne seraient que des impuretés.

TABLEAU RECAPITULATIF

Zones de mobilités 10^{-5} cm2/volt/sec.	Plasma séminal	Spermatozoïdes	
		Queues	Têtes
de 0 à 1	γ globuline du sérum	-	-
	-	$Q\beta_3$	$Q\beta_3$
de 1,2 à 2,5	$P\beta_2$ globuline	-	-
	$S\beta_2$ "	$S\beta_2$	-
	$S\beta_1$ "	$S\beta_1$	-
de 3,6 à 4,8	α_2 globuline du sérum	traces	-
	deux $S\alpha_2$ globulines	deux $S\alpha_2$	-
	$S\alpha_1$ globuline	$S\alpha_1$	-
	$P\alpha_1$ "	-	-
de 4,8 à 5,7	Albumine	traces	-
au-dessus de 5,7	$P\rho_1$ et $P\rho_2$		-

CHAPITRE III

FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS

Devant la complexité des extraits de spermatozoïdes que nous avons obtenus et le grand nombre de constituants que nous avons décelés, nous avons tenté de fractionner ces extraits, soit par relargage au Sulfate d'Ammonium, soit par élution de bandes de gélose découpées après séparation des constituants par électrophorèse en milieu gélifié.

I - RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM

METHODE - Nous avons précipité les protéines contenues dans les extraits totaux de queues avec du Sulfate d'Ammonium à 20, 35, 40 et 50 pour 100 de saturation, généralement à la température du laboratoire, et dans quelques cas à + 4°C (pour ne pas risquer de détruire l'activité enzymatique des protéines).

Les précipités étaient dissous dans ClNa à 8,5 pour 1.000 et dialysés contre le même milieu. Les fractions obtenues sont appelées :

C 20 %, C 35 %, etc... pour les précipités

S 20 %, S 35 %, etc... pour les surnageants

qui étaient aussi dialysés contre ClNa à 8,5 pour 1.000.

Le surnageant S 20 % était, dans quelques cas, reprécipité à 40 % de saturation. Ce précipité est alors appelé C 20-40 % et le surnageant final S 40 %.

Pour essayer de conserver le plus d'activité ATPasique possible, nous avons utilisé, au lieu d'un extrait dans ClNa à 8,5 pour 1.000 , un extrait total en solution de Weber Edsall. Après fractionnement par le Sulfate d'Ammonium, les précipités étaient dissous dans la solution de Weber Edsall et dialysés, ainsi que les surnageants correspondants, contre ce même milieu.

RESULTATS - Le premier fractionnement a été fait à 35 pour 100 de saturation sur un extrait total en ClNa à 8,5 pour 1.000. Nous avons constaté, au cours d'une analyse immuno-électrophorétique, que tous les constituants de l'extrait total étaient présents dans le surnageant et que le précipité contenait seulement une des $S\alpha_2$, les $S\beta_1$ et les $S\beta_2$ globulines (figure IV).

Nous avons ensuite précipité le surnageant S 35 % au Sulfate d'Ammonium pour obtenir une saturation de 50 pour 100. Tous les constituants de l'extrait total se trouvent alors dans ce précipité C 35-50 %. Par contre, le surnageant ne contient, en très faible quantité, que peu de constituants. Il donne deux lignes de précipitation correspondant à une α_1 globuline rapide ou à l'albumine, et à un constituant plus rapide.

De plus, en faisant réagir ces différentes fractions avec l'immunsérum anti-Têtes aT, nous avons constaté que seul le

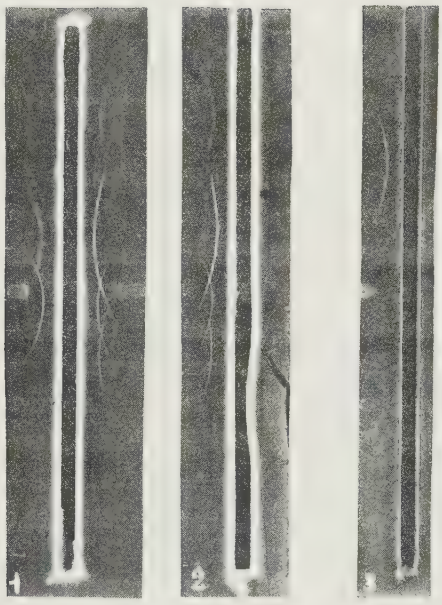


Fig. IV - Analyse immuno-électrophorétique des fractions de relargage.
1 - Précipité à 35 % de saturation, C 35 % et extrait total Q révélés par l'immunsérum anti-queues, aQ.
2 - Surnageant correspondant, S 35 %, révélé par aQ.
3 - Précipité entre 35 et 50 % de saturation révélé par l'immunsérum anti-têtes aT. Cette 3ème expérience n'a pas été effectuée en même temps que les deux précédentes, ce qui explique la légère différence de position de la $Q\beta_3$ globuline.

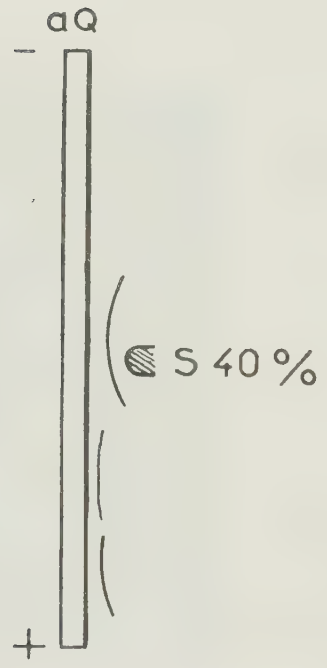


Fig. V - Schéma de l'analyse immuno-électrophorétique du surnageant après précipitation au sulfate d'ammonium à 40 % de saturation, S 40 %, révélé par l'immunsérum anti-queues aQ.

précipité entre 35 et 50 p. 100 de saturation contient la $Q\beta_3$ globuline.

D'autres expériences de précipitation à 20 et 40 p. 100 de saturation ont donné des résultats très similaires. Tous les constituants de l'extrait total se retrouvent dans le précipité entre 20 et 40 p. 100 de saturation.

Le précipité obtenu à 20 p. 100 de saturation, C 20 %, contient des traces d'α et β globuline, qui apparaissent difficilement à l'immuno-électrophorèse, et ont été mises en évidence après coloration au Rouge Ponceau. Nous avons pu alors remarquer la $S\alpha_1$ globuline lente dont la ligne de précipitation part du réservoir, une $S\alpha_2$ globuline en face du réservoir et la $S\beta_1$ globuline juste au-dessus du réservoir.

Dans le surnageant S 40 % (figure V), nous constatons la présence d'une α_2 globuline et de deux constituants rapides, comme dans le surnageant S 50 %. L'un migre comme l'albumine et correspondrait à ce constituant qui se trouve à l'état de traces dans l'extrait total. L'autre encore plus rapide, aurait la mobilité du constituant Pρ qui avait été décelé dans le plasma séminal. Il semble qu'il soit en trop faible quantité pour apparaître dans l'extrait total.

Dans quelques expériences, il apparaît aussi, dans S 40 %, une β_1 globuline qui est la même que la $S\beta_1$ globuline contenue dans C 20-40 % et dans C 20 %.

CONCLUSION - Le relargage au Sulfate d'Ammonium a donné des résultats curieux et décevants. En effet, on retourve tous les constituants de l'extrait total dans le précipité entre 35 et 50 p. 100 de saturation, et dans le précipité entre 20 et 40 p. 100 de saturation.

Le précipité obtenu à 20 p. 100 de saturation ne contiendrait que trois constituants au maximum : la $S\alpha_1$ globuline lente, une $S\alpha_2$ globuline et la $S\beta_1$ globuline.

Le surnageant S 50 % contiendrait un constituant rapide migrant comme le constituant ρ du plasma séminal, et le constituant analogue à l'albumine décelé dans l'extrait total avec certains lots d'immunsérums aQ. Dans S 40 % il apparaît de plus une des $S\alpha_2$ globulines de l'extrait total de la $S\beta_1$ globuline dans quelques expériences seulement. Il semble que les constituants rapides décelés dans S 40 % et S 50 % soient masqués par les autres protéines dans l'extrait total, où ils n'existent qu'à l'état de traces.

Ce fractionnement, quoiqu'assez peu satisfaisant, a cependant permis de préciser la mobilité de l'ATPase décelée dans les extraits de queues.

II - ELUTION DE LA GELOSE APRES ELECTROPHORESE EN MILIEU GELIFIE

METHODE - Sur les plaques d'électrophorèse dont la gélose a

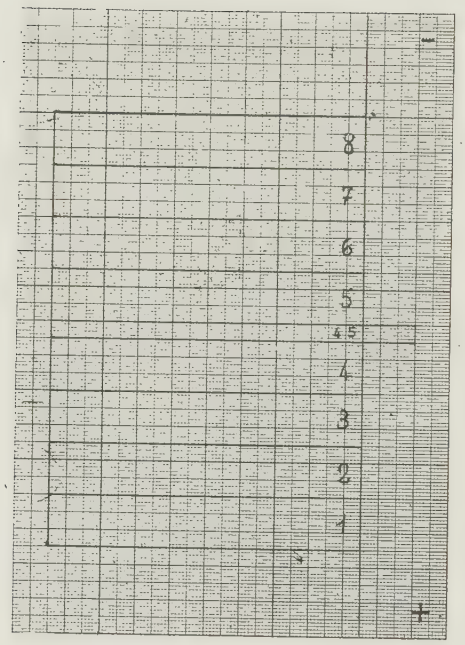


Fig. VI - Schéma du découpage des bandes de gélose après électrophorèse pour l'élution des protéines.

4 mm d'épaisseur (*), un seul réservoir de 0,5 cm de large est découpé sur toute la largeur de la plaque.

Après la migration qui est de 4 heures pour les plaques de 13 x 18 et 24 x 18, et de 1 heure 30 pour celles de 9 x 12, la gélose est découpée en 8 bandes parallèles au réservoir et de même largeur : 0,5 cm, 1 cm ou 1,5 cm suivant les expériences (figure VI), et ces bandes de gélose sont placées dans des tubes à essais. Les protéines, qui se trouvent dans ces différentes bandes après l'électrophorèse, sont éluées soit par un liquide solvant des protéines (ClNa à 8,5 p. 1.000, ou solution de Weber Edsall), soit par congélation et décongélation successives.

Le plus fréquemment trois ou quatre électrophorèses sont effectuées parallèlement dans des conditions identiques ; les bandes de gélose de même numéro sont ensuite réunies, de façon à obtenir une plus grande quantité de protéines. Les éluats recueillis sont alors concentrés par pervaporation et dialysés dans leur milieu d'extraction, avant d'être étudiés.

D'autre part, on réserve sur une des plaques une bande perpendiculaire au réservoir de 1,5 cm de large, qui est fixée, séchée et colorée à l'Amido-Schwartz afin de situer ainsi la position dans la gélose des constituants qui sont élués (figure VI).

(*) Un essai de 6 mm d'épaisseur a été tenté afin d'augmenter la capacité du réservoir, mais il s'est produit un trop grand échauffement pendant le passage du courant, ce qui a provoqué des craquements importants dans la gélose et obligé à interrompre à plusieurs reprises la migration pour refroidir la plaque.

RESULTATS -

1°/ Les premières expériences d'élution ont été effectuées dans le but d'isoler la globuline qui a la mobilité de la γ globuline sérique et que nous avons appelée précédemment la $Q\beta_3$ globuline.

Les bandes de gélose de 0,5 et 1 cm de large n'ont été découpées que dans la moitié de la plaque correspondant aux globulines de mobilité les plus lentes (figure VII) ; leurs positions avaient été repérées d'après une électrophorèse simple faite précédemment. Cinq bandes de gélose ont été éluées à plusieurs reprises avec du ClNa à 8,5 p. 1.000 et chaque éluat a été vérifié par l'épreuve du disque (ring-test) avec l'immunsérum aQ.

Deux expériences analogues ont été faites (la 2ème comportant une 6ème bande), et des précipitations spécifiques selon la méthode d'OUCHTERLONY ont permis de réunir les éluats possédant des constituants identiques, soit : d'une part, les fractions 1 et 2, et, d'autre part, les fractions 4,5 et 6. Les 3èmes fractions qui ne contenaient que des constituants communs aux deux autres fractions ont été supprimées. Les deux lots étudiés sont appelés 1,2 et 4,6.

En précipitation selon OUCHTERLONY, le lot 4,6 ne donne qu'une ligne de précipitation avec aQ, tandis que le lot 1,2 en donne deux très nettes et parfois 2 autres plus faibles (dont une serait peut-être identique à celle de 4,6).

Ces constituants ont été concentrés par pervaporation 2 à 3 fois et des analyses immuno-électrophorétiques ont été faites sur ces

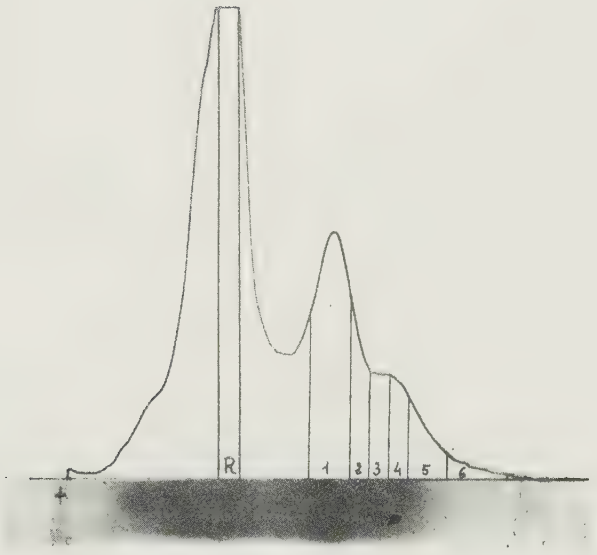


Fig. VII - Diagramme d'enregistrement d'une électrophorèse simple en milieu gélifié d'un extrait de queues.
Les numéros indiquent la position des bandes qui ont été découpées pour l'élution.

deux solutions concentrées. Seul 1,2 a donné 1 ligne de précipitation très nette avec l'immunsérum aQ ; le lot 4,6 n'en donne aucune. Nous n'avons pas pu concentrer ces fractions au-delà d'une certaine limite, car il se forme alors un précipité ; aucune ligne de précipitation avec 4,6 n'a donc pu être obtenue.

D'autre part, avec l'immunsérum aT aucune des deux fractions n'a donné de ligne de précipitation. Cependant le fait que la fraction 4,6 réagit positivement à l'épreuve du disque avec aQ et aussi très nettement avec aT permet de conclure que nous avons obtenu ainsi la $Q\beta_3$ globuline. La quantité obtenue et la concentration de la solution sont si faibles qu'il n'a pas été possible d'étudier cette fraction.

2°/ Elutions par congélation et décongélation.

Pour obtenir des éluats moins dilués, nous avons essayé de congeler et décongeler les bandes de gélose découpées dans les électrophorèses.

Nous avons utilisé alors soit 3 soit 4 plaques de 18 cm x 24 cm avec des réservoirs de 220 mm x 5 mm x 4 mm remplis de façon identique. Après électrophorèse de 4 heures à 100 volts, les bandes de 1,5 cm de large étaient découpées suivant la méthode décrite précédemment (figure VI), et aussitôt mises à congeler.

Avec les fractions obtenues, concentrées et dialysées contre ClNa à 8,5 p. 1.000, nous avons fait des précipitations en milieu gélifié selon OUCHTERLONY et des analyses immuno-électrophorétiques.

Quatre séries d'expériences ont été réalisées en changeant à chaque fois l'extrait de queues total et en modifiant, soit la concentration de l'extrait total, soit la méthode de concentration des fractions (sous vide à 37°, ou par pervaporation à la température du laboratoire, ou à 0°).

Les faibles différences constatées entre ces expériences ne semblent provenir que de l'électro-endosmose variant à chaque électrophorèse.

En précipitation selon OUCHTERLONY avec l'immunsérum aQ, nous n'avons pas obtenu de ligne de précipitation avec les fractions 1, 2, 7 et 8. Il apparaît dans la fraction 3, tantôt deux lignes de précipitation, tantôt aucune. La fraction 4 possède deux ou trois constituants dont un est identique à un des constituants de la fraction 3. Les fractions 5 et 6 possèdent un seul et même constituant qui est nettement différent des constituants de la fraction 4 (figure VIII).

Au cours de l'analyse immuno-électrophorétique de ces éluats avec le même immunsérum aQ (figure IX), la fraction 3 donne une ligne de précipitation que nous ne retrouvons pas dans toutes les expériences, assez allongée, au niveau des α_1 globulines rapides, et la fraction 4 la $S\alpha_1$ globuline lente qui apparaît toujours. La $S\beta_1$ globuline est révélée tantôt dans la fraction 5, tantôt dans la fraction 6. Mais nous n'avons pas pu faire apparaître les $S\beta_2$ et $Q\beta_3$ globulines. La fraction 4,5 correspondant au réservoir lui-même a donné soit la même ligne de précipitation que la fraction 4, soit celle de la fraction 5, et une fois seulement 2 lignes correspondant aux $S\alpha_2$ globulines.

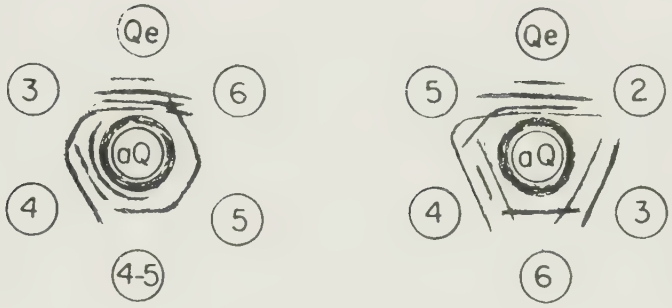


Fig. VIII - Comparaison des éluats révélés par l'immunsérum aQ, par la méthode de double diffusion selon OUCHTERLONY.

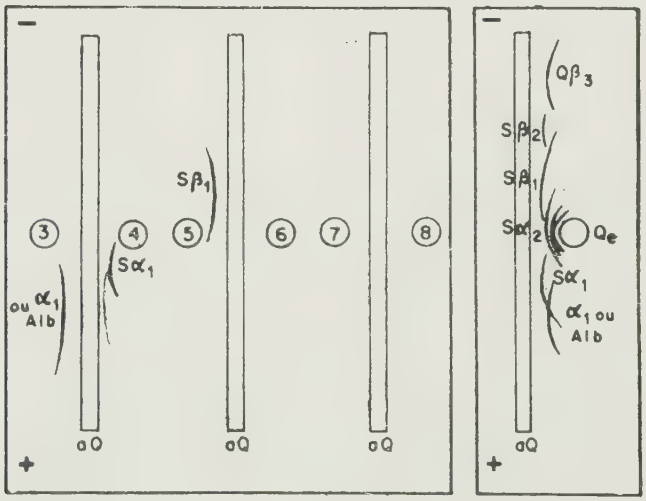


Fig. IX - Analyse immuno-électrophorétique des mêmes éluats avec l'immunsérum aQ.

CONCLUSION -

Il ressort de ces expériences d'élution, que l'isolement des constituants de l'extrait de queues de spermatozoïdes est peu facile, car les fractions obtenues sont très peu concentrées en protéines. Il est très difficile, en effet, de concentrer l'extrait total de départ, ainsi que les fractions elles-mêmes dont les constituants précipitent au cours de la concentration.

Les S α globulines et la S β_1 globuline, qui existent en plus grande quantité, sont les seules protéines décelables dans les éluats, mais à des concentrations trop faibles pour être étudiées par d'autres méthodes.

Ces expériences ont cependant permis de préciser la nature d'une des α globulines au cours de l'étude des enzymes contenus dans les spermatozoïdes.

REMARQUE -

Nous avons, d'autre part, tenté d'extraire des fractions glucidiques de la manière suivante :

Un extrait de spermatozoïdes a été précipité par l'acide trichloracétique à 10 %, à parts égales. Après centrifugation, le surnageant a été neutralisé à pH 7, et concentré sous vide. Cette fraction a pu être étudiée par électrophorèse simple en milieu gélifié et par analyse immuno-électrophorétique.

L'électrophorèse simple en milieu gélifié a permis de déceler deux fractions glucidiques : l'une au niveau des α_2 globulines sériques,

l'autre au niveau des β globulines sériques. Ces fractions ont été révélées par la technique de coloration des glucides de URIEL (46).

L'analyse immuno-électrophorétique avec l'immunsérum anti-queues, aQ, a fait apparaître trois lignes de précipitation : deux d'entre elles correspondent aux taches colorées obtenues ci-dessus et seraient une α_2 globuline et une β_2 globuline ; la troisième, très faible, correspond à l'albumine.

Avec l'immunsérum anti-têtes, aT, aucune ligne de précipitation n'est apparue. L'épreuve du disque était également négative.

Ces glycoprotéines obtenues à partir des queues de spermatozoïdes correspondent donc à l'une des $S\alpha_2$ globulines et à la $S\beta_2$ globuline. La troisième ligne de précipitation se confond avec celle de l'albumine, trouvée à l'état de traces dans l'extrait total de queues, et nous pouvons nous demander s'il s'est formé un complexe entre ces deux constituants.

CHAPITRE IV

RECHERCHE DE QUELQUES ENZYMES ET SPECIALEMENT DE L'ATPase

Comme les spermatozoïdes contiennent de nombreux enzymes, il nous a paru intéressant d'appliquer les méthodes immunochimiques qui, grâce à leur grande sensibilité, permettraient peut-être de les déceler, même s'ils n'existent qu'en très faibles proportions.

Il a ainsi été possible de montrer l'existence d'une estérase, par la méthode de mise en évidence de URIEL (46). Le substrat utilisé était l'acétate de β naphtyl dans un tampon phosphate à pH 7.

Une électrophorèse simple en milieu gélifié d'un extrait de queues, $Q\varphi$, et une analyse immuno-électrophorétique ($Q\varphi$ avec l'immunsérum aQ) ont été faites parallèlement. La coloration spécifique des estérases a permis de constater, au niveau de la β_1 globuline, une tache rose violacé après l'électrophorèse, et une ligne de précipitation de même couleur après immuno-électrophorèse. Cette ligne de précipitation est assez large et un peu floue, elle ne ressemble pas à celle de la β_1 globuline obtenue jusqu'ici dans les analyses immuno-électrophorétiques, même après coloration au Rouge Ponceau. Cette estérase semble donc être un constituant protéique qui ne peut être décelé qu'au moyen d'une coloration spécifique.

Nous avons tenté d'autre part de déceler une phosphatase alcaline en utilisant le phosphate de sodium α naphtyl (32) comme substrat. Il n'a pas été possible d'obtenir de coloration spécifique ni après l'électrophorèse en milieu gélifié, ni après l'analyse immuno-électrophorétique. Ceci est probablement dû au fait que la phosphatase, très fragile, a pu être détruite au cours des manipulations, et spécialement pendant les électrophorèses.

De plus, nous avons essayé d'appliquer, en milieu gélifié, la méthode décrite ci-dessous pour mesurer l'activité de l'ATPase directement dans ses solutions. Mais la coloration de la gélose elle-même n'a pas permis de différencier avec suffisamment de précision la position, après électrophorèse, de l'ATPase.

Cependant, en solution, il a été possible de mesurer l'activité de l'ATPase dans les extraits totaux et dans les fractions obtenues à partir de ceux-ci, ce qui a permis d'étudier quelques propriétés de l'ATPase. Nous avons enfin essayé de préciser sa mobilité électrophorétique.

METHODE DE MESURE DE L'ACTIVITE ATPasique

L'activité ATPasique est mesurée selon la technique décrite par NELSON (30) et DU BOIS et POTTER (6).

Le substrat utilisé est l'Adénosine-Tri-Phosphate (ATP) disodique (de la Compagnie Sigma), en quantité telle que 10 à 20 p. 100 du phosphore labile initial au maximum soit libéré pendant

la réaction. Le chlorure de Calcium a servi d'activateur. La réaction est faite à pH 7,5 en tampon véronal 0,05 M.

Les échantillons étudiés sont en solution soit dans ClNa à 8,5 p. 1.000, soit dans le milieu de Weber Edsall (solution de KCl 0,6 M tamponné par CO_3Na_2 0,01 M et CO_3HNa 0,04 M). Pour pouvoir comparer leurs activités ATPasiques, il est nécessaire que les prises d'essais soient à même concentration ionique et contiennent les mêmes ions. Il est donc ajouté dans le premier cas une solution de Weber Edsall, et dans le deuxième cas du ClNa, en concentration nécessaire.

La réaction enzymatique est effectuée au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes et arrêtée par addition d'acide trichloracétique à 10 p. 100. A chaque échantillon correspond un blanc identique dans lequel tous les réactifs sont les mêmes, mais où l'acide trichloracétique est introduit avant l'ATP.

Dans le surnageant obtenu après la précipitation des protéines par l'acide trichloracétique, le phosphore libéré par la réaction ($ATP \longrightarrow ADP + PO_4H_3$) est dosé selon la méthode de FISKE et SUBBAROW (9) modifiée par GOMORI (13) : le phosphore est transformé en phospho-molybdate, qui, après réduction par l'élon ou rhodol (sulfate de méthyl p. aminophénol), colore la solution en bleu. L'"intensité de la coloration est mesurée soit au photocolorimètre de l'Electro-Synthèse avec le filtre rouge N° 9, soit au spectrophotomètre de JOBIN-YVON sur une longueur d'onde de 675 mμ. Les courbes d'étalonnage des densités optiques sont faites pour les deux appareils avec une solution de phosphate monopotassique à 10 μg de phosphore par ml.

L'activité ATPasique est donnée en µg de P libéré à 37°C en 10 minutes par ml d'extrait, et, dans quelques cas, en µg de P libéré à 37°C en 10 minutes par mg d'azote.

RESULTATS

I - Etude de l'ATPase sur différents extraits totaux de queues

1°/ L'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en enzyme

L'activité ATPasique d'un extrait Qφ était mesurée dans la solution mère et dans la solution diluée de moitié avec ClNa à 8,5 p. 1.000. Chaque échantillon était fait en double. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Qφ	libère	38,8 µg de P par ml
Qφ/2	libère	19 µg de P par ml

Nous retrouvons ainsi les résultats déjà annoncés par DUBOIS et POTTER (6).

D'autre part , un extrait concentré deux fois par pervaporation à + 4°C libère deux fois plus de Phosphore par ml que l'extrait non concentré, et nous constatons à nouveau la proportionnalité.

Comme il faut une très longue pervaporation à + 4°C pour obtenir une telle concentration, nous avons, par la suite, effectué la

pervaporation à une température de + 8°C à + 10°C (à l'aide de deux ventilateurs fonctionnant dans le laboratoire), ce qui permet de concentrer très rapidement l'extrait tout en ne perdant que très peu d'enzyme.

Nous avons également tenté de concentrer un extrait sous vide, le bain-marie étant à 37°C, mais cette technique a dû être abandonnée car un extrait concentré 6 fois ne libère que 2,5 fois plus de phosphore par ml que l'extrait non concentré.

2°/ Action de la congélation sur l'ATPase

Au cours de l'étude de l'ATPase sur les éluats recueillis après électrophorèse par congélation-décongélation des bandes de gélose, nous avons été amenés à étudier l'action de la congélation sur cet enzyme.

Un extrait Q_φ qui possédait une activité de 50 μg de P par ml était réparti en plusieurs tubes et mis au congélateur à - 40°C. Le premier tube décongelé 4 jours après ne libérait plus que 37 μg de P par ml, et le deuxième décongelé 20 jours après ne possédait plus aucune activité.

Cette rapide destruction de l'ATPase par la congélation a été un obstacle important pour l'isolement de l'ATPase par la méthode d'élution après électrophorèse en gélose.

3°/ Comparaison des extraits $Q\varphi$, Q_{WE}, N.100 obtenus avec ou sans vibrations soniques

a) Comparaison de $Q\varphi$ et Q_{WE} extraits par vibrations soniques

Une suspension de spermatozoïdes de 90 cobayes, après lavages habituels, est exactement partagée en deux parties égales, puis centrifugée. Une moitié est remise en suspension dans 20 ml de ClNa à 8,5 p. 1.000 et l'autre dans 20 ml de solution de Weber Edsall.

Les deux suspensions sont désintégrées par les vibrations soniques pendant 30 minutes et laissées à la glacière pendant 48 heures.

Les activités ATPasiques des surnageants appelés $Q\varphi$ et Q_{WE} sont :

pour $Q\varphi$: 24 µg de P par ml
pour Q_{WE} : 42 µg de P par ml

D'autre part, l'activité d'un échantillon Q_{WE} qui est de 94 µg de P par ml passe, après dialyse contre le Chlorure de Sodium à 8,5 p. 1.000, à une activité de 51 µg de P par ml, soit presque la moitié. Un extrait $Q\varphi$ obtenu dans les mêmes conditions que Q_{WE} et servant de témoin libère 48 µg de P par ml (activités mesurées au cours de la même expérience) valeur très voisine de l'activité de Q_{WE} dialysé dans ClNa.

Nous constatons que le milieu de Weber Edsall extrait une plus grande quantité d'ATPase que ClNa à 8,5 p. 1.000, soit presque le double. Il est donc un meilleur solvant de cet enzyme.

b) Comparaison de Q_{WE} extrait avec ou sans vibrations soniques

Les spermatozoïdes d'une centaine de cobayes sont lavés selon la technique habituelle, puis remis en suspension dans 50 ml de solution de Weber Edsall. La suspension est alors partagée exactement en deux parties égales : une moitié est soumise aux vibrations soniques pendant 30 minutes tandis que l'autre moitié est conservée à + 4°C. Ils sont centrifugés 48 heures après et l'activité de l'ATPase est mesurée sur les deux surnageants Q_{WE}VS et Q_{WE}.

Q_{WE}VS librèe 66 µg de P par ml

Q_{WE} libère 148 µg de P par ml

Nous nous sommes alors demandé si la quantité de protéines extraites était la même dans les deux cas. Or, la quantité d'azote dosé au micro-Kjeldahl est :

pour Q_{WE}VS 1.040 µg de N par ml

pour Q_{WE} 584 µg de N par ml

Nous pouvons en déduire que Q_{WE} non VS est, par mg d'azote, presque quatre fois plus riche en ATPase que Q_{WE}VS (253 µg de P par mg de N et 63 µg de P par mg de N).

Il apparaît donc que si les vibrations soniques extraient une grande quantité de protéines, elles détruisent une grande partie de l'ATPase.

c) Comparaison simultanée de l'activité ATPasique des extraits

Afin de comparer les résultats précédents avec plus de précision et de faire une étude immuno-électrophorétique des différents extraits dans les mêmes conditions d'expérience, une même suspension de spermatozoïdes a servi à l'obtention des extraits dont on mesurait l'activité ATPasique.

Une suspension de spermatozoïdes lavés provenant de 70 cobayes est partagée en trois parties égales (I, II et III).

Après centrifugation, les culots sont remis en suspension comme suit :

I dans 12 ml de ClNa à 8,5 p. 1.000
II dans 12 ml de solution de Weber Edsall
III dans 12 ml de NaOH N/100

Ils sont conservés à + 4°C jusqu'au lendemain.

La suspension I est soumise aux vibrations soniques pendant 30 minutes et centrifugée à 0°. Le surnageant est l'extrait appelé Qφ VS.

Le culot est remis en suspension dans 12 ml de NaOH N/100 et partagé en 2 volumes égaux.

a) L'un est soumis aux vibrations soniques pendant 20 minutes, puis conservé à + 4°C.

b) L'autre est laissé aussitôt à + 4°C.

La suspension II est d'abord centrifugée et le surnageant mis de côté est appelé Q_{WE}. Le culot est remis en suspension dans 12 ml de NaOH N/100.

a) La moitié est soumise aux vibrations soniques pendant 30 minutes puis conservée à + 4°C.

b) L'autre moitié est conservée immédiatement à + 4°C.

La suspension III est de même partagée en deux volumes égaux.

a) L'un est soumis aux vibrations soniques pendant 30 minutes puis conservée à + 4°C.

b) L'autre est aussitôt laissé à + 4°C.

Les désintégrations au moyen des vibrations soniques ont été faites le même jour.

Le lendemain, les six suspensions sont centrifugées et les surnageants sont appelés comme suit :

I a (N.100 VS - Q_φ VS)

I b (N.100 - Q_φ VS)

II a (N.100 VS - Q_{WE})

II b (N.100 - Q_{WE})

III a N.100 VS

III b N.100

Les culots remis en suspension dans quelques ml de ClNa à 8,5 p. 1.000 ont permis de vérifier au microscope que seules les queues des spermatozoïdes étaient désintégrées, et que les têtes restaient inchangées.

Pour pouvoir faire une mesure d'activité enzymatique de ces différents extraits dans les mêmes conditions, une fraction de chacun des extraits dans la soude N/100 est dialysée contre la solution de Weber Edsall pendant trois jours à 0°. (Il ne s'est produit aucun précipité au cours de la dialyse).

Les résultats sont les suivants :

	Activités en µg de P par ml
I Q_φ VS	44,2
N.100 VS - Q_φ VS	60,5
N.100 - Q_φ VS	78,5

II	Q_{WE}	98,5
	N.100 VS - Q_{WE}	30
	N.100 - Q_{WE}	37
III	N.100 VS	123
	N.100	117

Nous constatons que, pour les extraits sodiques N.100, l'écart entre les activités ATPasiques des suspensions soumises ou non aux vibrations soniques est beaucoup moins important (et même insignifiant et inversé dans le dernier cas) que pour les extraits dans la solution de Weber Edsall où l'écart est du simple au double.

D'autre part, l'extrait obtenu directement dans la Soude N/100 (III) contient approximativement la même quantité d'ATP-ase que la somme des deux extraits obtenus successivement dans I et II.

		Activités en μg de P par ml
I	$Q\varphi$ VS + (N.100 VS - $Q\varphi$ VS)	104,7
	$Q\varphi$ VS + (N.100 - $Q\varphi$ VS)	122,7
II	Q_{WE} + (N.100 VS - Q_{WE})	128,5
	Q_{WE} + (N.100 - Q_{WE})	135,5
III	N.100 VS	123
	N.100	117

Il semble que la Soude N/100 finit d'extraire ce que les autres solvants n'avaient pas extrait.

L'analyse immuno-électrophorétique de tous ces extraits a été effectuée simultanément avec l'immunsérum anti-queues aQ. Elle a permis de constater que les extraits totaux $Q\varphi$ VS, Q_{WE}, N.100 VS et N.100 contiennent tous les mêmes constituants.

N.100 VS - $Q\varphi$ VS et N.100 - $Q\varphi$ VS donnent les mêmes lignes de précipitation : la $S\alpha_1$ globuline, une des $S\alpha_2$ globulines et très faiblement la $S\beta_1$ globuline. Dans une expérience précédente N.100 VS - $Q\varphi$ VS n'avait formé avec aQ qu'une seule ligne de précipitation très nette qui était la $S\alpha_1$ globuline. Mais l'activité ATPasique de cet extrait n'avait pas été mesurée.

Enfin N.100 VS - Q_{WE} et N.100 - Q_{WE} donnent probablement la même ligne de précipitation que la $S\alpha_1$ globuline mais extrêmement faible, malgré la coloration de la plaque au Rouge Ponceau.

Il est donc difficile d'affirmer déjà que l'ATPase correspondrait à la $S\alpha_1$ globuline des extraits de queues.

4°/ Activité ATPasique du plasma séminal

Le plasma séminal, tel qu'il a été défini dans les méthodes d'extraction, possède une activité ATPasique relativement importante malgré sa grande dilution.

Elle est de 74 µg de P par ml de solution, et passe, dans le plasma séminal concentré trois fois environ par pervaporation, à 177 µg de P par ml (2,4 fois plus que le plasma séminal non concentré).

Nous constatons ainsi que nous pouvons obtenir une plus grande concentration d'ATPase dans le plasma séminal que dans l'extrait de queues.

II - Activité ATPasique des fractions de relargage

Les fractions de relargage au Sulfate d'Ammonium étudiées précédemment par l'analyse immuno-électrophorétique ont également servi à l'étude de l'activité ATPasique. Toutes les précipitations ont été effectuées à + 4°C.

Les précipités sont ensuite remis en solution dans ClNa à 8,5 p. 1.000 et sont appelés C 20 %, C 40 %, etc. ; les surnageants correspondants sont appelés S 20 %, S 40 %, etc.

Au cours d'une première expérience nous avons constaté que l'ATPase existe dans le précipité C 40 %, et qu'il n'y a aucune activité dans le surnageant S 40 % ; dans le précipité C 20 % il y a déjà une petite quantité d'enzyme.

A partir de 3 ml d'extrait Q_{WE} qui possédait une activité ATPasique totale de 223 µg de P, nous avons retrouvé 195 µg de P dans C 40 % et aucune activité dans S 40 %. Mais d'après les

quantités d'azote mesurées par micro-dosage de Kjeldahl :

584 µg de N par ml dans Q_{WE}

408 µg de N par ml dans C 40 %

la quantité d'ATPase par mg d'azote n'est pas beaucoup plus grande dans C 40 % que dans Q_{WE}.

Q_{WE} libère 127 µg de P par mg de N

C 40 % libère 145 µg de P par mg de N

Nous avons réalisé des fractionnements à 25 % et 30 % de saturation en Sulfate d'Ammonium et les résultats ont été les suivants :

		Activités en µg de P par ml
à 25 %	Qφ VS	400
	C 25 %	174
	S 25 %	262
à 30 %	Qφ VS	305
	C 30 %	223
	S 30 %	120

Ce fractionnement n'apporte pas de résultats satisfaisants pour isoler l'enzyme.

Comme la fraction C 40 % contient tous les constituants de l'extrait de queues, il n'est pas encore possible de dire quel

constituant possède l'activité ATPasique. Par contre, nous avons montré que le surnageant S 40 %, (sans activité ATPasique) contenait une β_1 globuline, une α_2 globuline et les deux constituants les plus rapides (albumine et ρ).

Il est possible de conclure, par conséquent, que ce ne sont pas ces quatre constituants qui possèdent l'activité ATPasique.

Enfin 4 ml d'un extrait Q_{WE} reconcentré le plus rapidement possible ont été précipités à 20 % de saturation en Sulfate d'Ammonium. Le culot a été remis en solution dans 3 ml de solution de Weber Edsall et dialysé contre la même solution (C 20 %). Le surnageant est dialysé de même (S 20 %).

Une partie de S 20 % a été précipitée à 40 % de saturation en Sulfate d'Ammonium. Le culot est remis en solution dans 3 ml de solution de Weber Edsall. Le culot (C 20-40 %) et le surnageant (S 40%) sont dialysés contre la solution de Weber Edsall.

Nous avons mesuré les activités ATPasiques de ces fractions ainsi que de l'extrait total utilisé pour l'expérience. Les résultats sont les suivants (en μg de P libéré par le volume total) :

	Activités totales en μg de P
4 ml de Q_{WE}	548
C 20 % total	31
C 20-40 % total	471
S 40 %	0

Les dosages d'azote de ces solutions ont conduit aux résultats suivants :

	µg de N par ml	µg de P par ml	µg de P par mg de N
Q_{WE}	800	137	171
C 20 %	64	11,3	176
C 20-40 %	360	94	261

L'activité enzymatique par mg d'azote dans la fraction C 20-40 % n'a pas augmenté autant que nous l'attendions. Ceci est dû au fait que cette fraction contient encore tous les constituants (sauf peut-être le constituant rapide que nous décelons dans S 40 %).

L'examen des analyses immuno-électrophorétiques faites sur ces mêmes fractions montre que si C 20-40 % possède encore tous les constituants de l'extrait total, C 20 %, quoique très peu riche en protéines, laisse apparaître les trois lignes de précipitation suivantes : $1\alpha_1$ globuline lente juste en dessous du réservoir, $1\alpha_2$ globuline en face du réservoir et $1\beta_1$ globuline juste au-dessus du réservoir.

Puisque cet extrait C 20 % possède une activité ATPasique, ce ne peut être que l'un ou l'autre de ces trois constituants qui la possède. Or, la β_1 globuline se retrouve dans S 40 % qui n'est pas actif ; l'enzyme serait donc porté soit par l'α_1 globuline lente soit par l'α_2 globuline, soit par les deux.

Activité des fractions de relargage obtenues à partir du plasma séminal

Les résultats obtenus à partir du plasma séminal sont beaucoup plus complexes, puisque nous retrouvons l'activité dans toutes les fractions, même dans le surnageant après précipitation à 40 % de saturation. Ce dernier libère la même quantité de phosphore que le précipité entre 20 et 40 % de saturation. Nous pouvons penser qu'un constituant n'existant pas dans l'extrait de queues porterait aussi un groupement ATPasique.

Remarque -

Au cours de l'étude des différentes fractions actives ou non, nous avons constaté que les fractions non actives étaient toujours claires et limpides, et que les fractions actives étaient opalescentes ; cela d'autant plus que l'activité ATPasique était plus grande. Ainsi, le précipité à 40 % de saturation en Sulfate d'Ammonium, très riche en ATPase, qui est redissous dans ClNa à 8,5 p. 1.000 ou dans la solution de Weber Edsall est fortement opalescent alors que le surnageant qui n'a aucune activité est tout à fait limpide.

Aucune biréfringence n'a été trouvée dans les solutions opalescentes. (*)

(*) Nous remercions Monsieur JOLY qui a eu l'obligeance d'effectuer les mesures.

Il semblerait que cette opalescence des solutions soit liée à la présence de l'ATPase.

III - Activité ATPasique des fractions obtenues par élution

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les constituants élués à partir des bandes d'électrophorèses en gélose ont des mobilités bien définies, puisque, en faisant migrer séparément chaque éluat, il forme avec l'immunsérum aQ une ligne de précipitation au niveau exact où la bande de gélose avait été découpée initialement.

Nous avons pensé pouvoir, grâce à ces fractions obtenues par élution, déterminer avec plus de précision la mobilité électrophorétique de l'ATPase.

Nous avons étudié systématiquement l'activité ATPasique de tous les éluats après les avoir concentrés par les différentes méthodes décrites précédemment. Les résultats sont peu satisfaisants. De plus, comme l'ATPase est rapidement détruite par la congélation, une série d'expériences a été effectuée en éluant les bandes de gélose directement par la solution de Weber Edsall.

L'extrait total, soit Q_{WE}, soit N.100, était dialysé contre le tampon véronal pH 8,2, pour éviter un échauffement de la plaque et les craquements de la gélose qui s'en suivent, et non pas contre ClNa à 8,5 p. 1.000 qui faisait perdre presque la moitié de l'activité enzymatique.

Deux expériences n'ont pas permis de trouver une activité ATPasique dans les éluats. Nous avons donc pensé que l'enzyme était peut-être détruit au cours de l'électrophorèse.

Une dernière expérience était alors tentée en ne faisant migrer l'extrait total que pendant 1 heure 30. Les bandes de gélose étaient de 1 cm de large au lieu de 1,5 cm. L'extrait utilisé était un mélange des extraits dans la Soude N/100 qui libéraient 123 et 117 µg de P par ml. Il avait été dialysé contre le tampon véronal pour l'électrophorèse en gélose. Une partie de cet extrait a été redialysé contre la solution de Weber Edsall en vue de mesurer l'activité ATPasique. Son activité avait peu varié au cours de ces dialyses successives qui ont été effectuées à froid, (de 120 µg à 108 µg de P par ml).

Malgré la durée plus courte de l'électrophorèse, aucune activité n'a pu être mise en évidence dans les éluats.

Signalons cependant, qu'au cours des mesures spectrophotométriques, un très faible écart de densité optique s'observe pour la fraction 4 dans toutes les expériences, écart qui est légèrement plus grand dans la dernière expérience. Mais cette variation se trouve dans les limites d'erreurs faites sur les mesures de la densité optique. Nous pouvons seulement constater que la densité optique de la fraction 4 est systématiquement plus grande que celle des autres fractions, ce qui ferait penser qu'elle contient une très faible quantité d'ATPase.

Au cours d'une expérience cependant, après des élutions faites par congélation et décongélation, l'éluat n° 4, obtenu à partir d'un

extrait total libérant 41 µg de P par ml, était actif. Après sa concentration sous vide à 37°, il libérait 24 µg de P par ml. Compte tenu du fait qu'en concentrant 6 fois l'extrait total dans les mêmes conditions et au cours de la même expérience, l'enzyme n'était concentré que 2,5 fois seulement (cf. p. 43), l'activité totale retrouvée dans cet éluat n° 4 serait de 144 µg de P. L'extrait de queues, qui avait servi pour les trois électrophorèses simples, possédait une activité totale de 270 µg de P. L'activité retourvée dans cet éluat est donc la moitié environ ; de plus aucune adtivité n'est retrouvée dans les autres éluats de cette expérience.

Cet éluat n° 4 correspond à une fraction migrant comme les α_1 globulines et donne une ligne de précipitation très nette avec l'immunsérum aQ, correspondant à la $S\alpha_1$ globuline lente de l'extrait total.

Il semblerait donc que l'activité ATPasique est portée par cette $S\alpha_1$ globuline beaucoup plus sûrement que par l'α_2 globuline mentionnée aussi lors de nos recherches sur les fractions de relargage.

IV - Action des globulines du sérum de lapin normal sur l'ATPase

Après précipitation de l'extrait total Q_{WE} par l'immunsérum aQ, nous avons constaté que le précipité ne contenait pas la totalité de l'activité ATPasique initiale, et que le surnageant n'en possédait plus du tout.

Cette perte d'activité pourrait être due à l'inhibition de l'enzyme par les globulines du sérum. C'est pourquoi nous avons étudié l'action des globulines de sérum de lapins normaux sur l'ATPase.

A 1 ml de Q_{WE} nous avons ajouté soit 2 ml de globulines de aQ, soit 2 ml de globulines des sérums des mêmes lapins avant leur immunisation et préparées dans des conditions identiques. Les précipités sont centrifugés et remis en suspension dans 1 ml de solution de Weber Edsall. On constate que le précipité obtenu avec les globulines normales est insignifiant. Nous avons mesuré les activités ATPasiques des suspensions et des surnageants, ainsi que celle de l'extrait Q_{WE}. Les résultats sont les suivants :

Q_{WE}	Globulines	Activités totales en µg de P		Activités récupérées en µg de P
1 ml	0		91	
1 ml	aQ glob. 2 ml	Surn.^{t}	0	74
		Culot	74	
1 ml	glob. n^{les} 2 ml	Surn.^{t}	86	89
		Culot	3	

Les globulines normales, qui n'ont pas précipité l'ATPase, ne semblent pas inhiber non plus la réaction enzymatique.

D'autre part, avec les anticorps anti-enzymes, l'ATPase est entièrement précipitée, mais elle n'est pas retrouvée en totalité dans le précipité. L'anticorps semble, par contre, n'avoir neutralisé l'activité enzymatique que très partiellement. De plus, nous constatons que l'ATPase a provoqué, chez le lapin, la formation d'anticorps précipitants. Elle devrait donc former un arc de précipitation dans les analyses immuno-électrophorétiques. Ceci confirmerait qu'elle correspond bien à un des constituants antigéniques décelés dans les extraits de queues par les méthodes immuno-chimiques.

Conclusion -

Cette étude a permis de mettre en évidence quelques propriétés de l'ATPase contenue dans les spermatozoïdes de cobaye.

Sa fragilité est très grande : Elle se conserve à 0°, mais est rapidement détruite lorsque la température s'élève au-dessus de 10°. Elle est également détruite par la congélation à - 40°.

Les vibrations soniques (fréquence 10.000) qui extraient une plus grande quantité de protéines, détruisent simultanément une partie de l'ATPase. L'ATPase est donc moins concentrée par mg d'azote dans l'extrait Weber Edsall désintégré par les vibrations soniques que dans l'extrait Weber Edsall sans vibrations soniques.

La solution de Weber Edsall (pH 9 environ) et la Soude N/100 sont des meilleurs milieux d'extraction, que le ClNa à 8,5 p. 1.000.

L'aspect moiré des solutions obtenues par les différents modes d'extraction semble lié à la présence de l'ATPase.

La mobilité électrophorétique de l'ATPase paraît être celle d'une α_1 globuline ; l'ATPase correspondrait donc au constituant de l'extrait de queues appelé $S\alpha_1$ globuline.

Enfin, les globulines de lapins normaux ne précipitent pas l'enzyme et n'inhibent pas la réaction enzymatique. Il semble par contre, que l'activité de l'ATPase ne soit que très peu neutralisée par l'immunsérum anti-queues, et que l'anticorps correspondant soit bien un anticorps précipitant.

Un travail ultérieur sera poursuivi en vue d'isoler l'ATPase au moyen de la chromatographie sur colonne de cellulose, ce qui nous permettrait une étude plus approfondie sur cet enzyme séparé des autres constituants.

CONCLUSIONS GENERALES

Le présent travail avait pour objet l'étude des substances antigéniques contenues dans les spermatozoïdes et dans le plasma séminal de cobaye, au moyen des méthodes immunochimiques..

1°/ Les constituants ont pu être dénombrés et classés d'après leurs propriétés antigéniques et leurs mobilités électrophorétiques. Ils ont été comparés à ceux du sérum de cobaye qui a servi de système de référence.

Ces méthodes ont montré que les liquides biologiques étudiés sont très complexes. L'extrait de queues contient au moins 6 constituants : une $S\alpha_1$ globuline, deux $S\alpha_2$ globulines, une $S\beta_1$ et une $S\beta_2$ globulines, et une $Q\beta_3$ globuline (*).

Le plasma séminal contient au moins 12 constituants : les constituants rapides $P\rho_1$ et $P\rho_2$, une albumine, une $P\alpha_1$ et une $S\alpha_1$ globulines, deux $S\alpha_2$ globulines et une autre α_2 globuline, une $S\beta_1$, une $S\beta_2$ et une $P\beta_2$ globulines, et enfin, une γ globuline.

(*) S représente les constituants du sperme total (spermatozoïdes et plasma séminal),

Q les constituants spécifiques des extraits de queues,

P les constituants spécifiques du plasma séminal.

Tous les constituants des queues de spermatozoïdes, sauf la $Q\beta_3$ globuline, sont contenus dans le plasma séminal : ce sont la $S\alpha_1$ globuline lente, deux $S\alpha_2$ globulines, la $S\beta_1$ et $S\beta_2$ globulines. La $Q\beta_3$ globuline serait un constituant spécifique des spermatozoïdes qui se trouve non seulement dans les queues mais aussi dans les têtes. Aucun constituant , ni des têtes ni des queues, n'est contenu dans le sérum sanguin.

Le plasma séminal possède, de plus, trois constituants qui sont présents dans le sérum sanguin : l'albumine, une α_2 globuline et la γ globuline. Il semble que ces constituants soient présents dans le plasma séminal à la suite d'un processus qui a lieu "in vivo".

Un travail effectué sur le plasma séminal de taureau a montré que l'apparition, dans celui-ci, de constituants sériques serait probablement liée aux troubles de la fertilité.

Mais il faut néanmoins remarquer que, dans le cas du cobaye, où le prélèvement porte sur l'épidydime et le canal déférent, la proportion d'albumine (37 p. 100) est beaucoup plus grande que dans le cas du taureau où le plasma séminal est obtenu à partir de l'éjaculat (1 à 9 p. 100). Cet écart important semble être dû principalement à l'éloignement des deux espèces animales étudiées. En particulier, la perméabilité des tissus aux constituants sériques peut être très différente. Il paraît peu probable que le passage de constituants sériques à l'intérieur des épidydimes et du canal déférent puisse s'effectuer en sens inverse au niveau des vésicules séminales et de la prostate.

Le plasma séminal possèderait, enfin, des protéines qui lui sont propres : les constituants $P\rho_1$ et $P\rho_2$, la $P\alpha_1$ globuline et la $P\beta_2$ globuline.

2°/ Le relargage au sulfate d'ammonium à partir des extraits de queues de spermatozoïdes n'a pas permis d'isoler chacune des protéines de ce mélange. Nous constatons, cependant, que seules la $S\alpha_1$ globuline, une des $S\alpha_2$ globulines et la $S\beta_1$ globuline précipitent à 20 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. D'autre part, après précipitation à 40 p. 100 de saturation, le surnageant contient encore une $S\alpha_2$ globuline qui n'est entièrement précipitée qu'à 50 p. 100 de saturation : Le surnageant ne contient plus alors que l'albumine qui se trouvait à l'état de traces dans les extraits totaux et un constituant rapide analogue au constituant $P\rho$ présent dans le plasma séminal et qui n'a pas été décelé dans les extraits totaux de queues.

3°/ Les protéines obtenues par élution de bandes de gélose après séparation des constituants par électrophorèse en milieu gélifié, sont si peu concentrées qu'il n'a pas été possible de les étudier, ainsi séparées. Seules les $S\alpha$ globulines et la $S\beta_1$ globuline sont décelables dans les éluats, qui ont donné, par analyse immuno-électrophorétique, des lignes de précipitation au niveau même où les protéines avaient migré avant l'élution. Ces constituants ont donc des mobilités bien définies.

4°/ Des glyco-protéines ont été décelées dans les extraits de queues de spermatozoïdes. Leurs mobilités électrophorétiques correspondent à l'albumine, à l'une des deux $S\alpha_2$ globulines et à la $S\beta_2$ globuline.

5°/ Parmi les constituants antigéniques des spermatozoïdes, une estérase a été mise en évidence directement dans un extrait de queues, par une coloration spécifique du film de gélose après électro-

phorèse et après analyse immuno-électrophorétique. Ce serait une β_1 globuline différente de celle de l'extrait total de queues ; en effet, elle n'est pas décelée, dans ce dernier, par analyse immuno-électrophorétique même après coloration générale des protéines au Rouge Ponceau, où la $S\beta_1$ globuline présente une ligne de précipitation d'aspect différent.

La présence de l'Adénosine triphosphatase n'a pas pu être mis en évidence dans les extraits de spermatozoïdes par une méthode directe de coloration spécifique. Mais, en solution, son activité a été mesurée dans les extraits totaux et dans les fractions.

Quelques-unes de ses propriétés ont été étudiées. Elle se conserve à 0°C, mais est détruite rapidement au-dessus de 10°C et par la congélation à - 40°C. Les meilleurs milieux d'extraction de cet enzyme sont la solution de Weber Edsall (Chlorure de Potassium tamponné par du Carbonate de Sodium), et la Soude N/100. Les vibrations soniques (fréquence 10.000), qui extraient une grande quantité de protéines, semblent modifier profondément l'ATPase, puisqu'une grande partie de son activité est détruite. Ceci est en accord avec la facilité d'inactivation et de dénaturation de cet enzyme.

Les solutions possédant une activité ATPasique présentent toujours un aspect moiré qui n'est pas dû à un phénomène de biréfringence.

Tandis que les globulines normales n'ont pas d'action sur l'activité enzymatique de l'ATPase, les globulines de l'immunsérum anti-queues précipitent l'ATPase, ce qui permet de penser que

l'anti-enzyme est un anticorps précipitant. Mais, par contre, cet anticorps semble ne neutraliser que très partiellement l'ATPase.

Etant donné, de plus, la présence de l'ATPase dans certaines fractions de relargage au sulfate d'ammonium et son absence dans d'autres, il est permis de penser qu'elle correspondrait également à cette $S\alpha_1$ globuline.

ZIFF et MOORE (53) ont trouvé, pour l'ATPase de la myosine du muscle, une mobilité électrophorétique variant de 2,60 à 3,10 . 10^{-5} cm2/sec/volt pour des pH variant de 6,20 à 8,65. Si l'ATPase que nous avons trouvée dans les spermatozoïdes de cobaye correspond à la $S\alpha_1$ globuline, sa mobilité électrophorétique serait légèrement supérieure (4,2 . 10^{-5} cm2/sec/volt).

Mais nous pouvons nous demander si l'ATPase de la myosine du muscle de cobaye est identique à l'ATPase trouvée dans les spermatozoïdes. Il serait intéressant de les comparer par les méthodes immunochimiques. Ceci fera l'objet d'un prochain travail, dès que nous aurons obtenu des immunsérums avec l'ATPase du muscle.

De plus, il est logique d'admettre que, parmi les nombreux enzymes contenus dans les spermatozoïdes, c'est l'ATPase qui jouerait un rôle important dans la motilité de ces cellules. Aussi voudrions-nous tenter de l'isoler par d'autres méthodes.

Nous avons, au cours de ce travail, constaté que le plasma séminal et l'extrait de spermatozoïdes contiennent de nombreux constituants antigéniques.

Il n'est pas encore possible de savoir si les lésions testiculaires et les réactions anaphylactiques obtenues par VOISIN et par FREUND sont dues à certains de ces constituants. En effet, VOISIN ne semble pas, jusqu'à présent, avoir mis en évidence d'auto-anticorps précipitant (sauf dans deux cas seulement). D'autre part, le constituant responsable de la formation d'un auto-anticorps serait résistant à l'ébullition, alors que tous nos constituants ont été dénaturés par ce traitement. Il est donc impossible, pour le moment, de classer cet auto-antigène parmi les constituants antigéniques que nous avons dénombrés.

Enfin, comme la présence, dans le plasma séminal, de l'albumine et probablement d'autres constituants sériques, tel que la γ globuline, semble jouer un rôle important dans la fertilité des spermatozoïdes, il serait intéressant d'entreprendre une étude similaire sur le plasma séminal humain, au moyen des méthodes immunochimiques.

BIBLIOGRAPHIE

1 - BRUGGEMANN, J. et coll. Beiträge zur Biochemie von Sperma und Eiselle Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung, 1954, 4, III.

2 - CHAIN, E. et DUTHIE, E.S. Identity of hyaluronidase and spreading factor Brit. J. Exp. Path., 1940, 21, 324.

3 - CHAMBERS, L.A., FLOSDORF, E.W. Sonic extraction of labile bacterial constituents. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1936, 34, 631.

4 - DALE, H.H., The anaphylactif reaction of plain muscle in the guinea pig. J. Pharmacol. Exp. Thérap., 1913, 4, 167.

5 - DELAUNAY, A. et VOISIN, G. Les hyaluronidases et leurs propriétés biologiques. La Presse Médicale, 1950, 58, n° 2.

6 - DUBOIS, K.P. et POTTER, V.R. The assay of animal tissues for respiratory enzymes III. ATPase. J. Biol. Chem., 1943, 150, 185.

7 - ENGELHARDT, W.A. L'acide phosphorique et les fonctions cellulaires. Bull. Acad. Sci., U.R.S.S., Ser. Biol., 1945, 182.

8 - ENGELHARDT, W.A., BURNASHEVA, S.A. On the localization of the spermosin protein in sperm cells. Biochimia, 1957, 22, 554.

9 - FISKE, C.H. et YELLAPRAGADA SUBBAROW. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.

10 - FREUND, J., LIPTON, M.M., THOMPSON, G.E. Aspermatogenesis in the guinea pig induced by testicular tissue and adjuvants. J. Exp. Med., 1953, 97, 711.

11 - FREUND, J., LIPTON, M., THOMPSON, G.E. Aspermatogenesis in guinea pig after injection of homologous testicular material or spermia with adjuvants. Fec. Proceed., 1953, 12, 443.

12 - FREUND, J., THOMPSON, G.E., LIPTON, M.M., Aspermatogenesis, anaphylaxis, and cutaneous sensitization induced in the guinea pig by homologous testicular extract. J. Exp. Med., 1955, 101, 591.

13 - GOMORI, G., A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. J. Lac. Clin. Med., 1942, 27, 955.

14 - GRABAR, P., WILLIAMS, C.A. Jr. Methode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 193.

15 - GRABAR, P. et WILLIAMS Jr. C.A. Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 67.

16 - HENLE, W., HENLE, G., CHAMBERS, L.A. Studies on the antigenic structure of same mammalian spermatozoa J. Exp. Med., 1938, 68, 335.

17 - HENLE, W. The specifity of some mammalian spermatozoa J. immunol., 1938, 34, 325.

18 - HUGGINS, C., SCOTT, W.W., HEINEN, J.H., Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. Am. J. Physiol., 1942, 136, 467.

19 - KATSH, S. Demonstration in vitro of anaphylactoid response of the uterus and ileum guinea pigs injected with testis or sperm. J. Exp. Med., 1958, 107, 95.

20 - KATSH, S. In vitro anaphylactic and non-anaphylactic responses of organs of immunized guinea pigs. J. Pharmacol., Exper. Therap. 1958, 124, 86.

21 - LARDY, H.A. PHILLIPS, P.H. The effect of certain inhibitors and activators on sperm metabolism. J. Biol. Chem. 1941, 138, 195.

22 - LARSON, B.L., SALISBURY, G.W. The proteins of bovine seminal plasma I. Preliminary and electrophoretic studies. J. Biol. Chem., 1954, 206, 741.

23 - LARSON, B.L. GRAY, R.S. SALISBURY, G.W. The proteins of bovine seminal plasma. II Ultracentrifugal and immunological studies and comparison with blood and milk serum. J. Biol. Chem. 1954, 211., 43.

24 - MAC LEOD, J., WROBLEWSKI, F. Lactic dehydrogenase activity in human semen. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (USA), 1958, 99, 265.

25 - LOISELEUR Techniques de Laboratoire I vol., Masson Edit. (Paris) ; 1954.

26 - LUNDQUIST, F. Proteolytic enzymes in human semen. in Ciba Symposium "Mammalian germ cells" ed. by Wolstenholme and Freemon London, J. and A. Churchill 1953, p. 71-81.

27 - MANN, T. Biochimie du Sperme. Paris, P.V.E., 1956, 271 p.

28 - METALNIKOFF Etudes sur la spermatoxine. Ann. Inst. Pasteur, 1900, 14, 577.

29 - MUDD, S., MUDD, E.B. Specificity of mammalian spermatozoa with special reference to electrophoresis as a means of serological differenciation. J. immunol., 1929, 17, 39.

30 - NELSON, L. Enzyme distribution in fragmented bull spermatozoa I. adenylpyrophosphatase. Biophys. Biochim. Acta, 1954, 14, 312.

31 - OUCHTERLONY, O., Antigen-antibody reactions in gels. Arkiv. f. Kemi Mineralogi o geologi, 1949, 26 B, n° 14.

32 - PEARSE, A.G.E. Histochemistry I vol. J.A. Churchill Ltd. Ed. (London). 1960, p. 872.

33 - PERNOT, E., SZUMOWSKI, P. Etude électrophorétique et immuno-électrophorétique des protéines du plasma séminal de taureau. Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 1423.

34 - RAO, S.S., SHETH, A.R., PHADKE, A.M. A preliminary note on the succinic dehydrogenase activity of human semen. Indian J. of Med. Sci., 1959, 13, 302.

35 - ROSS, V. Precipitin reactions of human seminal plasma J. Immunol., 1946, 52, 87.

36 - ROSS, V., MOORE, D.H., MILLER, E.G. Proteins of human seminal plasma J. Biol. Chem., 1942, 144, 667.

37 - RUMKE, Ph. HELLINGA, G. Auto-antibodies against spermatozoa in sterile men. Am. J. of. Clin. Pathology, 1959, 32, 357.

38 - SALVINIEN, J. et KAMINSKI, M. Manifestations du phénomène de Liesegang en Immunochimie. C.R. Acad. Sci., 1955, 240, 257.

39 - SALVINIEN, J. et KAMINSKI, M. Comment essayer de reconnaître ou d'éviter le phénomène de Liesegang en Immunochimie. C.R. Acad. Sci., 1955, 240, 377.

40 - SCHULTZ, W.H. Physiological studies in anaphylaxis. I. the reaction of smooth muscle of the guinea pig sensitized with horse serum. J. Pharmacol. Exper. Therap., 1910, I, 549.

41 - SMITH, A.U. Some antigenic properties of mammalian spermatozoa. Proc. Roy. Soc. (London), 1949, B.136, 46.

42 - SZUMOWSKI, P. Quelques résultats de l'examen électrophorétique des protéines du plasma séminal de taureau. Proc. of the III Intern. Cong. on Anim. Reproduc. Cambridge, 1956.

43 - SZUMOWSKI, P., STOBER, M. Sur les protéines du plasma séminal de cheval. Ann. Zoot. I.N.R.A., 1955, 2, 165.

44 - URIEL, J. et SCHEIDEGGER, J.J. Electrophorèse en gélose et coloration des constituants. Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 165.

45 - URIEL, J., GRABAR, P. Emploi de colorants dans l'analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique en milieu gélifié. Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 427.

46 - URIEL, J. in GRABAR, P. et BURTIN, P. L'analyse immuno-électrophorétique : ses applications aux milieux biologiques humains. I volume, Masson Edit. (Paris), 1960, p. 33.

47 - VOISIN, G.A., DELAUNAY, A., BARBER, M. Sur des lésions testiculaires provoquées chez le cobaye par iso et auto-sensibilisation. Ann. Inst. Pasteur, 1951, 81, 48.

48 - VOISIN, G.A. DELAUNAY, A. Mise en évidence d'un état d'iso ou d'auto-sensibilisation au moyen du choc anaphylactique. Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, 556.

49 - VOISIN, G.A., TOULET, F., MAURER, P. The nature of tissular antigens with particular reference to auto-sensitization and transplantation immunity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1958, 73, 726.

50 - WAKSMAN, B.H. A histologic study of the auto-allergic testis lesion in the guinea pig. J. Exp. Med., 1959, 109, 311.

51 - WEIL, A.J., KOTSEVALOV, O., WILSON, L. Antigens of human seminal plasma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 606.

52 - WILLIAMS, Jr. C.A., GRABAR, P. Immuno-electrophoretic studies on serum proteins. I. The antigens of juman serum. J. Immunol., 1955, 74, 158.

53 - ZIFF, M., MOORE, D.H. Electrophoresis, sedimentation and ATPase activity of myosin. J. Biol. Chem., 1944, 153, 653.

54 - ZITTLE, Ch. A., O'DELL, R.A. Chemical studies of bull spermatozoa. Lipide, sulfur, cystine, nitrogen, phosphorus and nucleic acid contents of whole spermatozoa and of the parts obtained by physical means. J. Biol. Chem., 1941, 140, 899.

55 - ZITTLE, Ch. A., ZITIN, B. The amount and distribution of cytochrome oxydase in bull spermatozoa. J. Biol. Chem., 1942, 144, 99.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

« L'immunofluorescence : ses principales applications »

Vu et approuvé :

Paris, le 25 Février 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY.

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE.